

2020 年 12 月

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit

## ハンドブック

バージョン 2



50 (カタログ番号 762174)

R4 **MAT** 1122120JP

**REF** 762174

**IVD**

**CE**



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
PreAnalytiX 用に QIAGEN GmbH が製造

PreAnalytiX

A QIAGEN / BD Company

商標：PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (QIAGEN Group); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

PAXgene Blood RNA Kit は、一部の国ではご利用いただけません。お問い合わせください。

#### 制限付きライセンス契約

本製品を使用することで、PAXgene Blood RNA Kit の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものと見なされます。

1. PAXgene Blood RNA Kit は、必ず *PAXgene Blood RNA Kit Handbook* に従い、キットに含まれるコンポーネントを使うことによるのみ使用できます。PreAnalytiX は、*PAXgene Blood RNA Kit Handbook* と [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) に掲載されている追加プロトコールで説明されている場合を除き、いかなる知的財産のもとにおいて、本キットに含まれていないコンポーネントと共に、本キットに含まれるコンポーネントを使用したり、組み込んだりするのためのいかなるライセンスも許諾いたしません。
2. 明示的に言及されているライセンスを除き、PreAnalytiX は、本キットやその使用が第三者の権利を侵害していないことを保証いたしません。
3. 本キットとそのコンポーネントは 1 回のみ使用についてライセンスが許諾されるのであり、再利用、再生、再販はできません。
4. PreAnalytiX は明示的に言及されているものを除き、明示・黙示を問わず、他のあらゆるライセンス許諾を具体的に否認します。
5. 本キットの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為を容易にする一切の手段を許容しないことに同意します。
6. PreAnalytiX は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本キット、本限定ライセンス契約、およびそのコンポーネントに関する所有する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項については、[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) を参照してください。

#### 条件付き販売

本製品には、US-7,270,953、および US-7,682,790 の特定のクレーム、ならびに EP-1820793 B1、およびこのような特許クレームの外国の同等物に基づいて、PAXgene Blood RNA Tube へのサンプル採取の過程で形成される核酸複合体を処理するために製品を使用するライセンスが伴っています。

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, all rights reserved.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

スイス

[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

#### PreAnalytiX 販売代理店

PreAnalytiX の製品は、PreAnalytiX に向けて QIAGEN または BD が製造し、販売していません。PreAnalytiX GmbH に製品を発注することはできません。


お近くの PreAnalytiX 販売代理店の連絡先については、最後のページをご覧ください。

# 目次

キットの内容	5
図記号	6
保存条件	7
使用目的	8
製品の使用に関する制限事項	8
品質管理	9
技術的な支援	9
安全情報	10
はじめに	14
原則と手順	14
サンプル採取と安定化	14
RNA の濃縮と精製	20
手動 RNA 精製	20
自動化 RNA 精製	30
ユーザーが準備する装置と試薬	39
重要な注意	42
QIAcube 機器の使用	42
QIAcube 機器にプロトコルをインストール	45
QIAcube 機器をロード	46
プロトコル: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血から トータル RNA を手動精製	57

プロトコール: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血から トータル RNA を自動精製 .....	65
トラブルシューティングガイド .....	72
付録 A : RNA 取り扱いの一般的注意事項 .....	75
付録 B: トータル RNA の品質の定量と測定 .....	76
付録 C : PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の取り扱い .....	78
発注情報 .....	80
製品説明書の改訂履歴 .....	82

# キットの内容

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
カタログ番号			762174
試薬数			50
BR1	Resuspension Buffer (再懸濁バッファー)	RES BUF	20 mL
BR2	Binding Buffer* (結合緩衝液*)	BIND BUF	18 mL
BR3	Wash Buffer 1* (洗浄バッファー1*)	WASH BUF 1	45 mL
BR4	Wash Buffer 2 (洗浄バッファー2) (濃縮) †	WASH BUF 2 CONC	11 mL
BR5	Elution Buffer (溶出バッファー)	ELU BUF	6 mL
RNFW	RNase-Free Water (bottle) (RNase フリー水 (ボトル))	PEL WASH	2 × 125 mL
PK	Proteinase K (green lid) (プロテイナーゼK (緑色の蓋))	PROTK	2 × 1.4 mL
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (PAXgene RNA スピнкаラム (赤色))	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (2 ml) (処理チューブ (2 mL))	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (二次 BD Hemogard™ クロージャ)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (マイクロ遠心チューブ (1.5 mL))	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, RNase フリー (凍結乾燥))	DNA REM	1500 Kunitz ユニット †
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (DNA 消化バッファー (白色の蓋))	DNA DIG BUF	2 × 2 mL
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (DNase 再懸濁バッファー (チューブ、 紫色の蓋))	DNase RES BUF	2 mL
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (PAXgene Shredder スピнкаラム (紫色))	PAXgene SHRED COL	5 × 10
ハンドブック	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Version 2) (PAXgene Blood RNA Kit Handbook (バージョン2))		1

\* 漂白剤を含む消毒試薬と共に使用することはできません。グアニジン塩を含みます。10 ページの安全情報を参照してください。

† 洗浄バッファー2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96~100%、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。

‡ Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25° C、pH5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の A<sub>260</sub> 増加を引き起こす DNase I の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J.Gen.Physiol.33, 349, 363)。

## 図記号



<N>回の試験に必要な試薬が含まれます。



製品説明書参照



使用者



体外診断用医療機器



カタログ番号



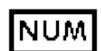
ロット番号



マテリアル番号



コンポーネント



番号



照射による滅菌方法



Kunitz ユニット



追加



含有物質



再構成



デオキシリボヌクレアーゼ I



エタノール

**GITC**

グアニジンイソチオシアナート

**RNase-Free DNase Set**

RNase フリー-DNase セット

**GTIN**

グローバルトレードアイテム番号



再使用しないこと



温度制限



温度上限



製造者



重要な注意

## 保存条件

PAXgene RNA スピンカラム (PRC)、PAXgene Shredder スピンカラム (PSC)、プロテイナーゼ K (PK)、およびバッファー (BR1、BR2、BR3、BR4、BR5) は、キットのラベルに表示している温度の乾燥した環境で保存する必要があります。

DNase I (RNFD)、DNA 消化バッファー (RDD)、DNase 再懸濁バッファー (DRB) を含む RNase フリー-DNase セットは、常温で出荷します。RNase フリー-DNase セットの全コンポーネントは、受領し次第、ラベルに記載されている温度環境で保存してください。適切に保存すれば、キットは箱に記載されている有効期限まで安定した状態を保ちます。

## 使用目的

PAXgene Blood RNA System は、採血管（PAXgene Blood RNA Tube、BRT）と核酸精製キット（PAXgene Blood RNA Kit）で構成されています。これは、血液の採取、保存、および輸送と密閉管内での細胞内 RNA の安定化、ならびにその後の、分子診断テストで使用する RT-PCR 用の全血からの宿主 RNA の分離と精製を目的としています。

**PAXgene Blood RNA System の性能特性は、FOS および IL1B 遺伝子転写産物でのみ確立されています。ユーザーは責任を持って、他のターゲット転写産物に対して適切な PAXgene Blood RNA System の性能特性を確立しなければなりません。**

## 使用の適応

PAXgene Blood RNA Kit は、PAXgene Blood RNA Tube（BRT）で採取した全血からの細胞内 RNA 精製に使用します。キットを PAXgene Blood RNA Tube（BRT）と併用すると、このシステムにより、分子診断テストで使用する RT-PCR 用に、全血から精製した細胞内 RNA が得られます。

## 製品の使用に関する制限事項

PAXgene Blood RNA Kit は、体外診断アプリケーション用に、ヒト全血（ $4.8 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$  白血球/ml）から細胞内 RNA を精製することを目的としています。ヒト全血からのゲノム DNA やウイルス核酸の精製を目的としません。安定化に関する仕様に向けて検証されている転写産物（FOS および IL1B 遺伝子転写産物）の数が限られているため、すべての転写産物について性能特性が確立されているわけではありません。ユーザーは、製造者のデータと自身のデータを確認し、他の転写産物に向けて検証が必要か否かを判断する必要があります。



この製品は、体外診断手順の訓練を受けた技師や医師などの専門家ユーザーが使用するためのものです。

PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の使用に関する情報は、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックに記載されています。

## 品質管理

QIAGEN の ISO 認定品質管理システムに従い、既定の仕様に照らし合わせて PAXgene Blood RNA Kit の各ロットの検査が行われ、製品の一貫した品質が保証されています。

## 技術的な支援

QIAGEN は、質の高いテクニカルサポートとその優れた有用性を誇っています。弊社のテクニカルサービス部門には、分子生物学および PreAnalytiX 製品の使用について幅広い実務的および理論的な専門知識を持つ経験豊かな研究者が配属されています。PAXgene Blood RNA Kit についてご不明な点がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

技術的な支援と詳細な情報については、QIAGEN テクニカルサービスまでお問い合わせください。

# 安全情報

EU：ユーザーは、デバイスに関連する重大なインシデントを製造元および国の規制当局に報告する必要があります。EU 以外の国々：デバイスに関連するインシデントやお問い合わせについては、最寄りの **QIAGEN** 担当者にお問い合わせください。

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。

生物学的物質や化学的物質を扱う際に感染するリスク（HIV ウイルスや B 型肝炎ウイルスなどの感染）や負傷するリスクを回避するため、常に適切な実験用白衣、使い捨て手袋、および保護メガネを装着してください。詳細については、適切な安全データシート（SDS）をご覧ください。これは、このキットの SDS を検索、表示、および印刷可能な [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) から、便利でコンパクトな PDF 形式で入手することが可能です。

## 注意



サンプル調製廃棄物に直接漂白剤や酸性の溶液を混ぜないでください。

結合緩衝液（BR2）と洗浄バッファー1（BR3）にはチオシアン酸グアニジンが含まれており、漂白剤と混ぜると高反応性化合物が生じる可能性があります。結合緩衝液（BR2）または洗浄バッファー1（BR3）がこぼれた場合は、適切な実験室用洗浄剤と水で洗浄してください。こぼれた液に感染病原体が含まれる可能性がある場合は、まず汚染された部分を実験室用洗浄剤と水で洗浄し、その後、次亜塩素酸ナトリウムの 1%（v/v）水溶液（漂白剤）で洗浄してください。

PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の RNA 安定化溶液と血液混合物は、9 容量の RNA 安定化溶液と血液混合物あたり 1 容量の市販の漂白剤溶液 (5%次亜塩素酸ナトリウム) を使用して消毒できます。

RNA 精製手順の遠心分離ステップ由来上清などのサンプル調製廃棄物は、潜在的に感染性があると見なされます。廃棄する前に、廃棄物をオートクレーブ処理または焼却して、感染性物質を破壊する必要があります。廃棄は、公的規制に従って行う必要があります。

次のハザードおよび警告に関する表示は、PAXgene Blood RNA Kit のコンポーネントに適用されます。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の安全情報については、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックをご参照ください。

#### バッファーBR2



含有物質: チオシアン酸グアニジン危険! 飲み込むと有害。皮膚に接触したり、吸入すると有害であるお恐れがある。重篤な目の損傷を引き起こす可能性がある。長期間にわたり持続的に水性生物に有害性をもたらす恐れがある。酸に接触すると有毒性の高いガスが発生する。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用すること。目に入った場合: 数分間かけて入念に水で洗い落とす。コンタクトレンズを装着しており、それを容易に外せるときは外して洗眼を続ける。直ちに中毒センター、または医師に連絡する。

### バッファーBR3



含有物質: エタノール、チオシアン酸グアニジン危険! 可燃性のあ  
る液体や蒸気が発生する。重篤な目の損傷を引き起こす可能性が  
ある。酸に接触すると有毒性の高いガスが発生する。熱、火花、  
裸火、高温の表面から遠ざける。禁煙。防護用手袋、防護服、目  
および顔面の保護具を使用すること。目に入った場合: 数分間かけ  
て入念に水で洗い落とす。コンタクトレンズを装着しており、そ  
れを容易に外せるときは外して洗眼を続ける。直ちに中毒センタ  
ー、または医師に連絡する。

### DNase I



含有物質: DNase 危険! 皮膚のアレルギー反応の原因となる可能性  
がある。吸入すると、アレルギーやぜんそくの症状や呼吸困難を  
引き起こす可能性がある。粉塵、煙、ガス、ミスト、蒸気、噴霧  
を吸入しないこと。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具  
を使用すること。呼吸器用保護具を装着する。曝露したとき、ま  
たは曝露が懸念されるとき: 中毒センター、または医師に連絡す  
る。被害者を風通しの良好な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で安  
静にさせる。

## プロテイナーゼ K



含有物質：プロテイナーゼ K。危険！皮膚への軽い刺激の原因となる。吸入すると、アレルギーやぜんそくの症状や呼吸困難を引き起こす可能性がある。粉塵、煙、ガス、ミスト、蒸気、噴霧を吸入しないこと。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用すること。呼吸器用保護具を装着する。曝露したとき、または曝露が懸念されるとき：中毒センター、または医師に連絡する。被害者を風通しの良好な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で安静にさせる。

## はじめに

全血採取は、細胞の RNA 研究に使用する多くの分子アッセイの第一段階です。しかし、このような実験においては、*in vitro* では細胞の RNA プロファイルが不安定なことが大きな問題となります。PreAnalytiX の研究によると、全血中の個々の mRNA 種のコピー数は、常温で保存または輸送中に 1000 倍以上変化する可能性があります。\*これは、急速な RNA 分解と、採血後の特定の遺伝子の誘発発現の両方によって引き起こされます。RNA 発現プロファイルのこのような変化は、遺伝子発現の信頼できる研究を不可能なものにします。したがって、瀉血中および瀉血後の RNA 発現プロファイルを保存する方法は、ヒト全血における遺伝子発現の正確な分析に必要不可欠です。

## 原則と手順

PreAnalytiX は、細胞内 RNA を精製する迅速かつ効率的なプロトコールと共に、ヒト全血検体の採取、安定化、保存、輸送を可能にするシステムを開発しました。このシステムでは、採血と RNA 安定化に PAXgene Blood RNA Tubes (BRT : 米国特許 6,602,718 および 6,617,170) を使用した後、PAXgene Blood RNA Kit を使用して手動または自動 RNA 精製を行う必要があります。手動プロトコールと自動プロトコールはどちらも、RNA の品質と収量に関して実質的に同等の性能を提供します。このハンドブックには、手動プロトコール ( 23~30 ページ ) と自動プロトコール ( 32~36 ページ ) の性能データが含まれています。



QIAGEN QIAcube Connect MDx は、一部の国ではご利用いただけません。詳細については、QIAGEN テクニカルサービスにお問い合わせください。

## サンプル採取と安定化

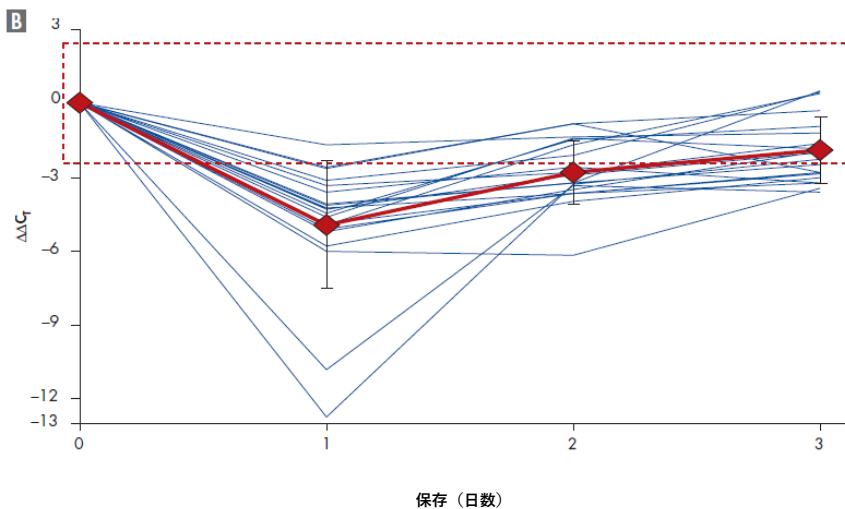
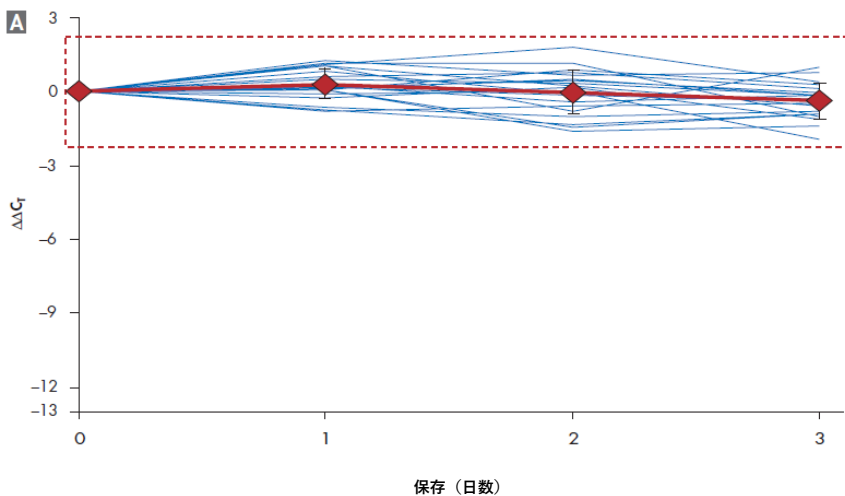
PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) には、特許取得済みの RNA 安定化技術に基づく独自の試薬組成物が含まれています。この試薬組成物は、RNA 分子を RNase による分解から保

\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

護し、遺伝子発現の *ex vivo* での変化を最小限に抑えます。TPAXgene Blood RNA Tubes (BRT) は、ヒト全血の採取および、18~25° C で最大 3 日間 (16 および 17 ページの図 1 および 2) または 2~8° C で最大 5 日間 (18 および 19 ページの図 3 および 4) の細胞 RNA の安定化を目的としています。現在入手可能なデータは、-20° C または -70° C で少なくとも 11 年間、細胞 RNA が安定していることを示しています\*。長期安定性を評価する進行中の試験の詳細については、QIAGEN テクニカルサービスにお問い合わせください。

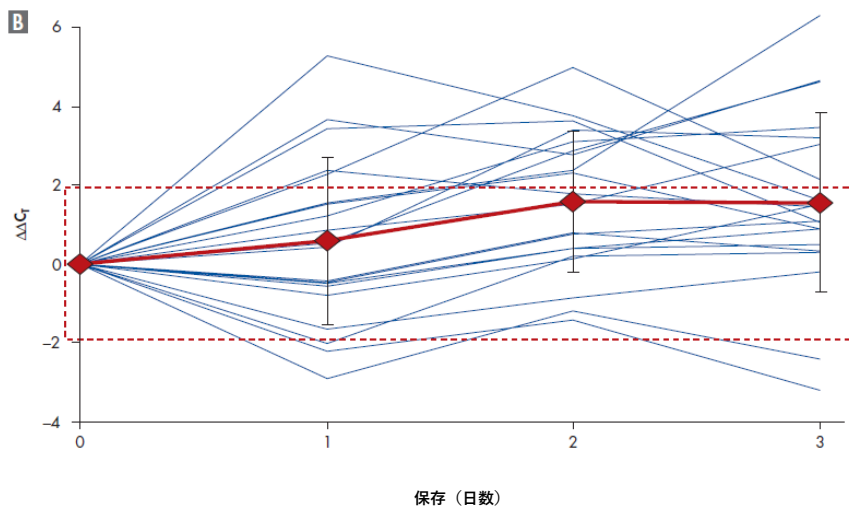
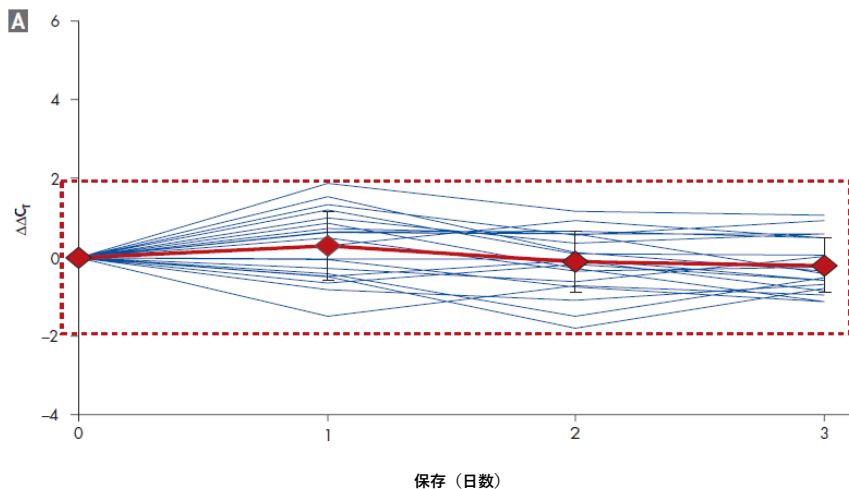
実際の RNA 安定化期間は、細胞 RNA の種類と使用するダウンストリームアプリケーションにより異なる場合があります。安定化に関する仕様に向けて検証されている転写産物 (FOS および IL1B 遺伝子転写産物) の数が限られているため、すべての転写産物について性能特性が確立されているわけではありません。ユーザーは、製造者のデータと自身のデータを確認し、他の転写産物に向けて検証が必要か否かを判断する必要があります。

\* PAXgene Blood RNA Tube での血液保存の長期試験が進行中です。

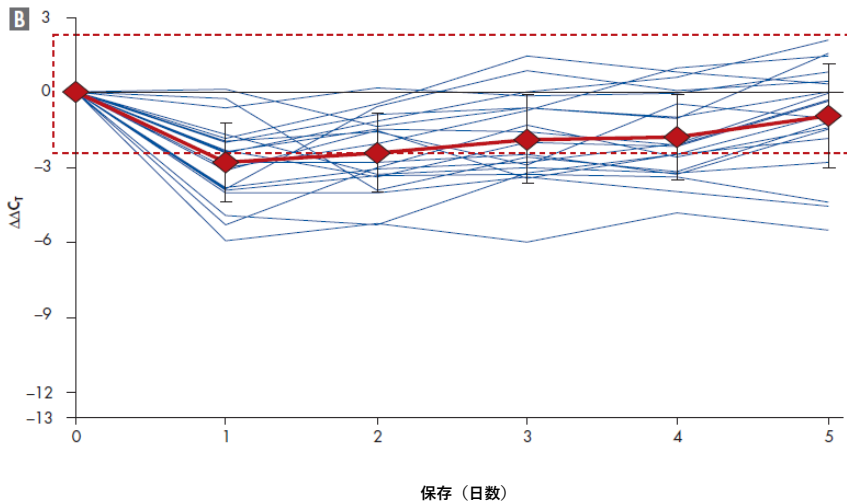
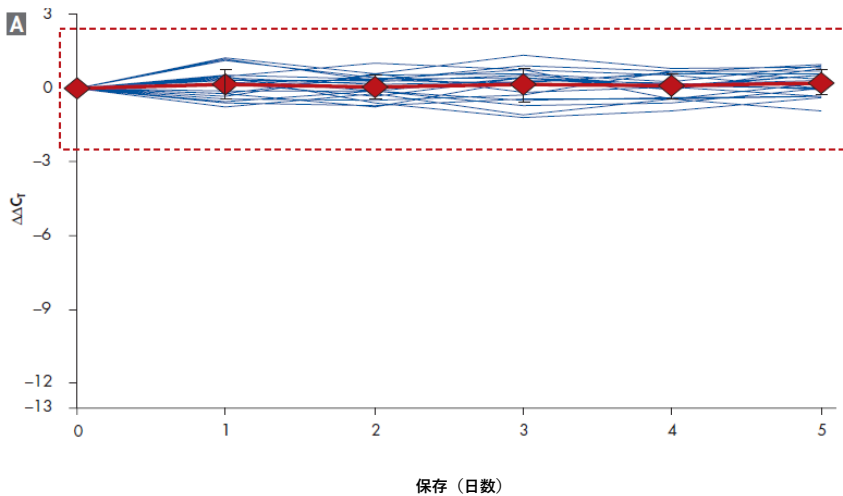


**図 1.18**  $18\sim 25^{\circ}\text{C}$  での血液サンプルの RNA 安定性：FOS。ドナー10人から採血。二重サンプルを  $18\sim 25^{\circ}\text{C}$  で、指定された日数にわたり保存した後、トータル RNA を精製。**[A]** 採血し、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に保存し、PAXgene Blood RNA Kit を使用してトータル RNA を精製。**[B]** 採血し、抗凝固剤として EDTA を使用して標準採血管に保存し、シリカ膜ベース RNA クリーンアップを用いる標準有機抽出メソッドを使用してトータル RNA を精製。FOS の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、リアルタイム二重 RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍 ( $2.34\text{ Ct}$ ) を示す。

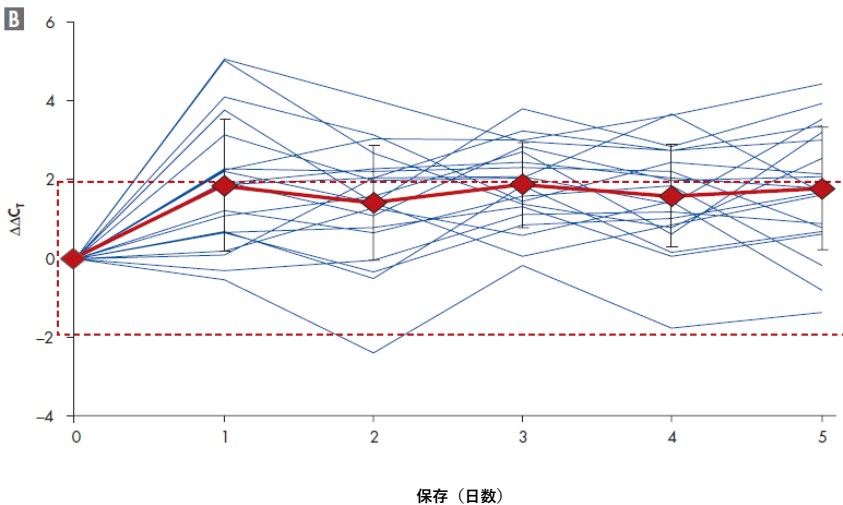
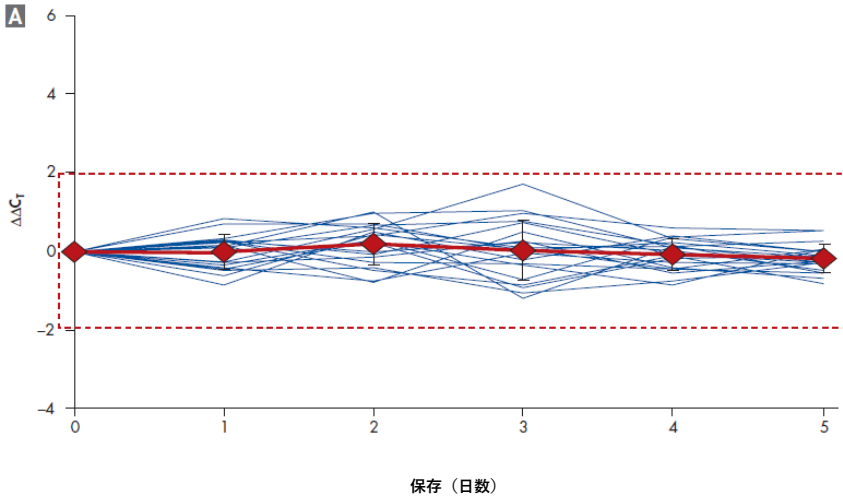




**図 2. 18~25° Cでの血液サンプルの RNA 安定性：IL1B。** 図 1 に示すように、18~25° C で保存後、採血してトータル RNA を精製。IL1B の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、リアルタイム二重 RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍 ( $1.93 C_t$ ) を示す。



**図 3.2**  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  での血液サンプルの RNA 安定性：FOS。ドナー 10 人から採血。二重サンプルを  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  で、指定された日数にわたり保存した後、トータル RNA を精製。**[A]** 採血し、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に保存し、PAXgene Blood RNA Kit を使用してトータル RNA を精製。**[B]** 採血し、抗凝固剤として EDTA を使用して標準採血管に保存し、シリカ膜ベース RNA クリーンアップを用いる標準有機抽出メソッドを使用してトータル RNA を精製。FOS の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、リアルタイム二重 RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍 ( $2.34 C_t$ ) を示す。



**図 4.2~8° Cでの血液サンプルの RNA 安定性：IL1B。** 図 3 に示すように、2~8° C で保存後、採血してトータル RNA を精製。IL1B の相対転写産物レベルは、内部標準として 18S rRNA を使用して、リアルタイム二重 RT-PCR によって測定。全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値と標準偏差を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍 ( $1.93 C_t$ ) を示す。

## RNA の濃縮と精製

PAXgene Blood RNA Kit は、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取したヒト全血 2.5 mL からのトータル RNA 精製に使用します。手順は簡単で、手動または自動化手順を使用して実行できます (21 および 31 ページの図 5 および 10 参照)。どちらのプロトコルでも、精製は、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で核酸をペレット化する遠心分離ステップから始まります。ペレットを洗浄して再懸濁した後、手動または自動で RNA を精製します。原則として、両プロトコルは、同じキットコンポーネントを使用して同じプロトコルステップに従います。

### 手動 RNA 精製

詳細には、再懸濁したペレットをプロテイナーゼ K (PK) と共に最適化したバッファーでインキュベートし、タンパク質を消化させます。PAXgene Shredder スピニングカラム (PSC) を通して追加遠心分離を実行し、細胞溶解物をホモジナイズし、残存細胞破片を除去し、フロースルー画分の上清を新しいマイクロ遠心チューブに移します。エタノールを添加して結合条件を調整し、溶解物を PAXgene RNA スピニングカラム (PRC) に適用します。短時間の遠心分離中、RNA は PAXgene シリカメンブレンに選択的に結合し、汚染物質は通過します。残りの汚染物質は、いくつかの効率的な洗浄ステップで除去します。1 回目と 2 回目の洗浄ステップの間に、メンブレンを DNase I (RNFD) で処理して、微量の結合 DNA を除去します。洗浄ステップの後、RNA を溶出バッファー (BR5) に溶出し、熱変性させます。

PAXgene Blood RNA System を使用して分離したトータル RNA は純粋です。手動プロトコルを使用すると、 $A_{260}/A_{280}$  値は 1.8~2.2 であり、ベータアクチン遺伝子配列の定量 real-time PCR で測定すると、全サンプルの 95%以上に 1% (w/w) 以下のゲノム DNA が存在します。溶出液の最大 30%を使用すると、サンプルの少なくとも 95%は RT-PCR で障害を示しません。

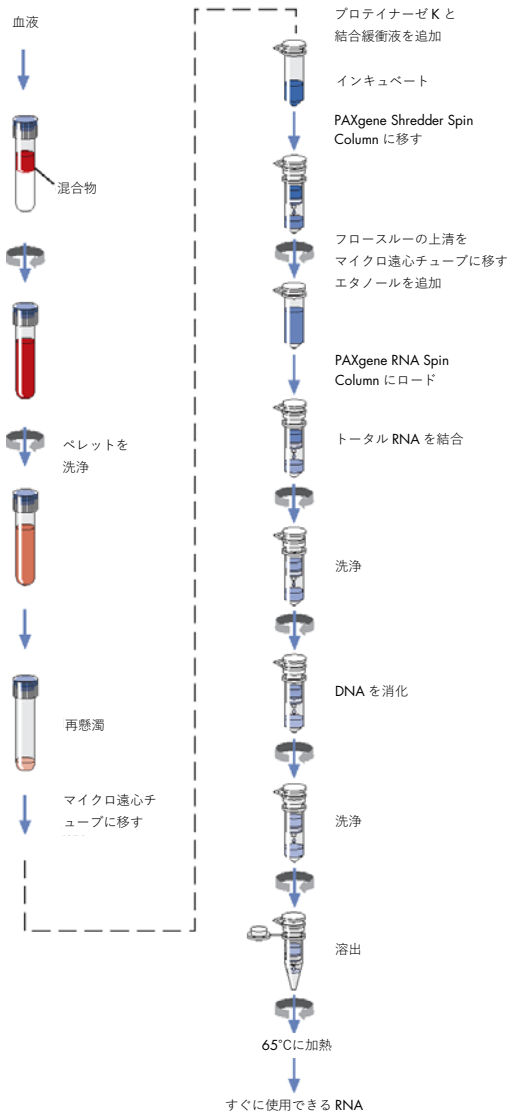
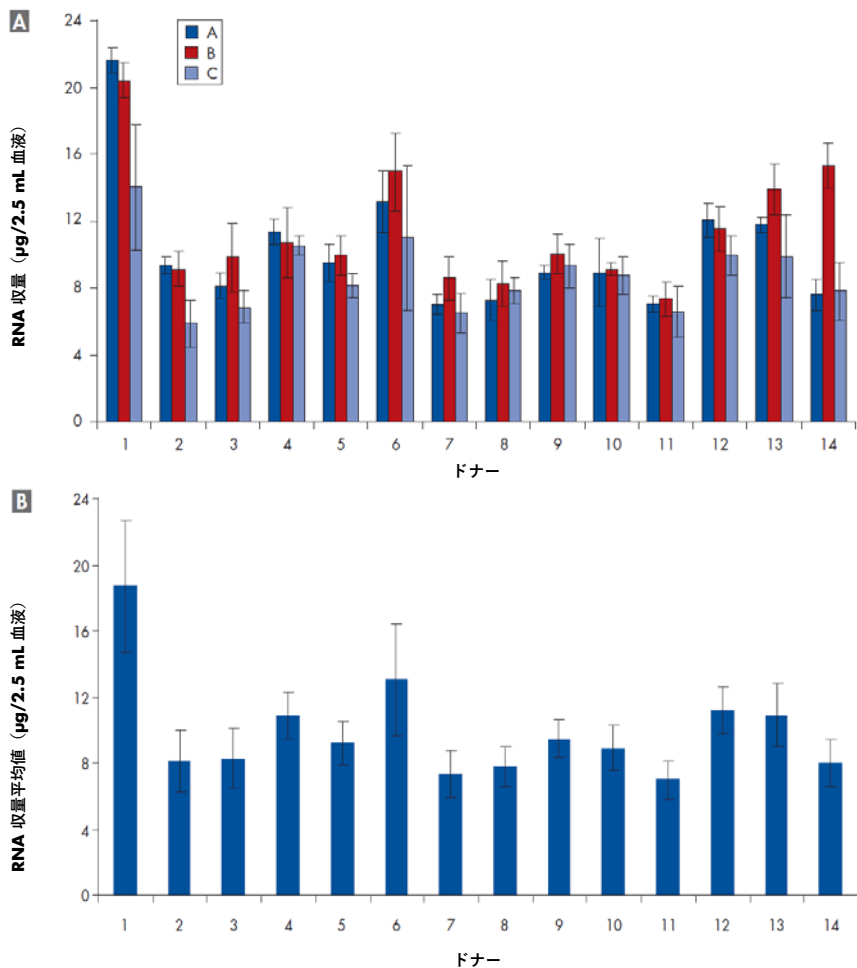


図 5. 手動 PAXgene Blood RNA 手順。

手動プロトコールを使用すると、平均サンプル調製時間（サンプル調製 12 回のデータに基づく）は約 90 分であり \*、実際の操作時間はわずか 40 分です。健康なヒト全血 2.5 mL からの RNA 収量は、処理したサンプルの 95% 以上で 3 µg 以上です。収量はドナーに大きく依存するため、個々の収量は異なる場合があります。個々のドナーに対して、PAXgene Blood RNA システムでは、再現性と反復性の高い収量（23 および 24 ページの図 6 および 7）と再現性と反復性のある RT-PCR（28 および 29 ページの図 8 および 9）が得られ、臨床診断テストに高いロバスト性を示します。

図 6（23 ページ）は、PAXgene Blood RNA システムの全体的な再現性と反復性を示します。RNA 収量の再現性とリアルタイム RT-PCR 性能に対するさまざまな PAXgene Blood RNA キットロットとさまざまなオペレーターの影響を示すために、追加試験を行いました。このような試験では、個々の PAXgene Blood RNA Tube（BRT）の代わりにプールした血液サンプルを使用したため、結果は、個々の採血間の変動を含むシステム再現性を反映しておらず、サンプル調製の再現性のみを反映しています（24 ページの図 7 参照）。

\* PAXgene Blood RNA Tube の事前処理（遠心分離、ペレット洗浄、ペレット再懸濁）を含むプロトコールの総実行時間。



**図 6.再現性と反復性のある RNA 精製。**ドナー14人の4重血液サンプルを、技師3人（A、B、C）の各々が手動で処理。機器3セットを使用。技師1人が全サンプルを調製し、同じ機器を使用して処理。**[A]**同じドナーと異なる技師由来の複製サンプルあたりのRNA収量の平均値と標準偏差。**[B]**ドナー14人各々由来の12複製血液サンプルを、異なる技師3人が処理。同じドナーと全技師由来のサンプルあたりのRNA収量の平均値と標準偏差。全RNAサンプルで、 $A_{260}/A_{280}$ 比の範囲は1.8~2.2。

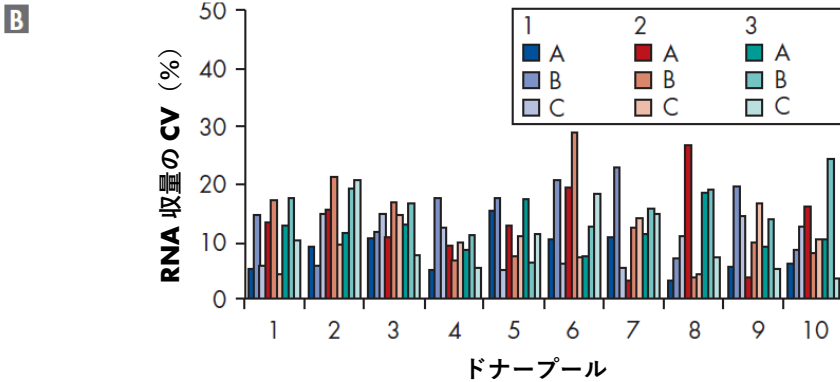
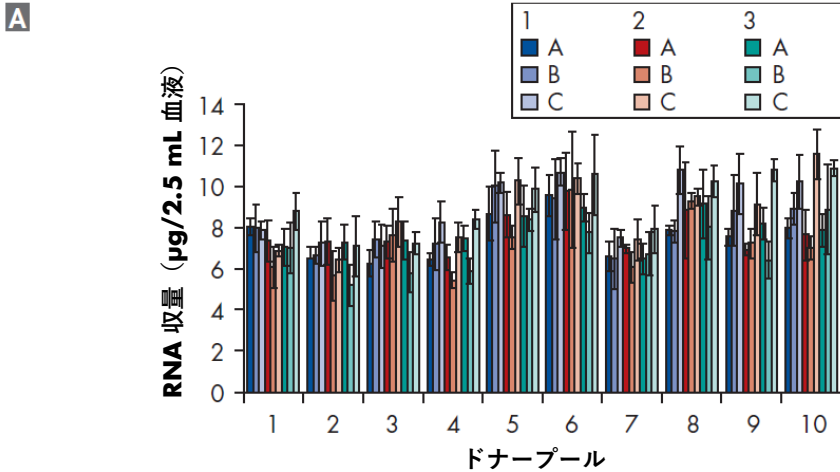


図7. プールした血液サンプルを使用したときの、異なるオペレーターと PAXgene Blood RNA Kit ロットに対する RNA 収量の再現性と反復性。異なるドナー30人の血液サンプルを、PAXgene Blood RNA Tube (BRT、ドナーあたり12チューブ、合計360チューブ)に採取。ドナー3人のチューブの内容物をプールしてから、36サンプルに再分注。3ドナープールあたりこの36サンプルを、異なるオペレーター3人が手動で処理。各オペレーターは、抽出に3つの異なる PAXgene Blood RNA Kit ロットを使用し、10ドナープール各々から4重サンプルを処理。各オペレーターとロットのすべての組み合わせの RNA 収量と標準偏差。10ドナープールの4重血液サンプルを、3つのキットロット(1、2、3)各々を用いて、異なるオペレーター3人(A、B、C)が処理。異なるオペレーターおよび異なるキットロットに対する同じドナープールの4重サンプルあたりの平均収量(列)と標準偏差(エラーバー)を表示。[B] 図7Aに示す平均収量と収量の標準偏差から計算した、オペレーターとロットの全組み合わせ(A、B、C; 1、2、3)に対するドナープールあたりの RNA 収量の CV。



表 1A. 選択したドナープール（1、6、9、10）の各ロット内および各ユーザー内の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、ユーザーA	8.03	0.42	5	9.55	0.99	10
ロット 1、ユーザーB	7.98	1.17	15	9.38	1.94	21
ロット 1、ユーザーC	7.87	0.45	6	10.71	0.65	6
ロット 2、ユーザーA	7.32	0.98	13	9.78	1.89	19
ロット 2、ユーザーB	6.09	1.04	17	9.82	2.83	29
ロット 2、ユーザーC	6.87	0.31	4	10.37	0.74	7
ロット 3、ユーザーA	7.04	0.90	13	8.96	0.68	8
ロット 3、ユーザーB	6.98	1.22	17	7.73	0.97	13
ロット 3、ユーザーC	8.78	0.89	10	10.59	1.94	18
データの組み合わせ	ドナープール 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、ユーザーA	7.52	0.41	6	7.96	0.49	6
ロット 1、ユーザーB	8.82	1.72	19	8.90	0.76	9
ロット 1、ユーザーC	10.14	1.46	14	10.22	1.29	13
ロット 2、ユーザーA	6.92	0.27	4	7.63	1.23	16
ロット 2、ユーザーB	7.20	0.71	10	7.00	0.56	8
ロット 2、ユーザーC	9.14	1.52	17	11.56	1.21	10
ロット 3、ユーザーA	8.18	0.76	9	7.85	0.82	10
ロット 3、ユーザーB	6.41	0.88	14	8.88	2.17	24
ロット 3、ユーザーC	10.78	0.56	5	10.88	0.37	3

表 1B. 選択したドナープール（1、6、9、10）の各ユーザー内および全ロット間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ユーザーA、全ロット	7.46	0.85	11	9.43	1.22	13
ユーザーB、全ロット	7.02	1.31	19	8.98	2.09	23
ユーザーC、全ロット	7.84	0.98	13	10.56	1.15	11
データの組み合わせ	ドナープール 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ユーザーA、全ロット	7.54	0.72	10	7.81	0.82	11
ユーザーB、全ロット	7.48	1.50	20	8.26	1.54	19
ユーザーC、全ロット	10.02	1.34	13	10.89	1.10	10

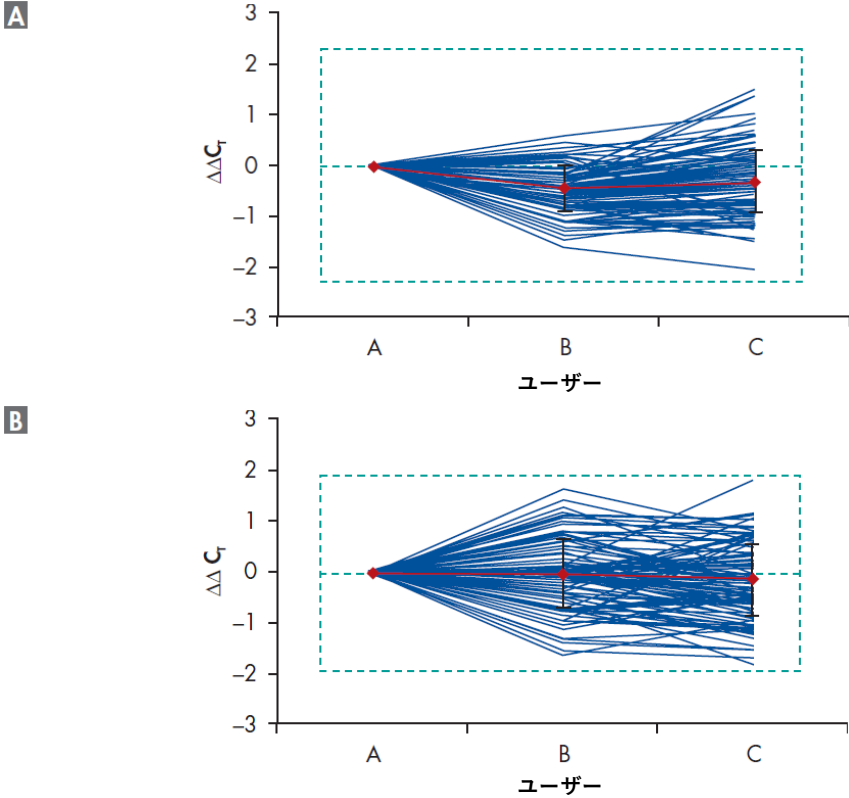
表 1C. 選択したドナープール（1、6、9、10）の各ロット内および全ユーザー間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	7.96	0.69	9	9.88	1.34	14
ロット 2、全ユーザー	6.76	0.93	14	9.99	1.84	18
ロット 3、全ユーザー	7.60	1.27	17	9.09	1.71	19
データの組み合わせ	ドナープール 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	8.83	1.63	19	9.02	1.27	14
ロット 2、全ユーザー	7.75	1.36	18	8.73	2.31	26
ロット 3、全ユーザー	8.46	1.99	24	9.20	1.80	20

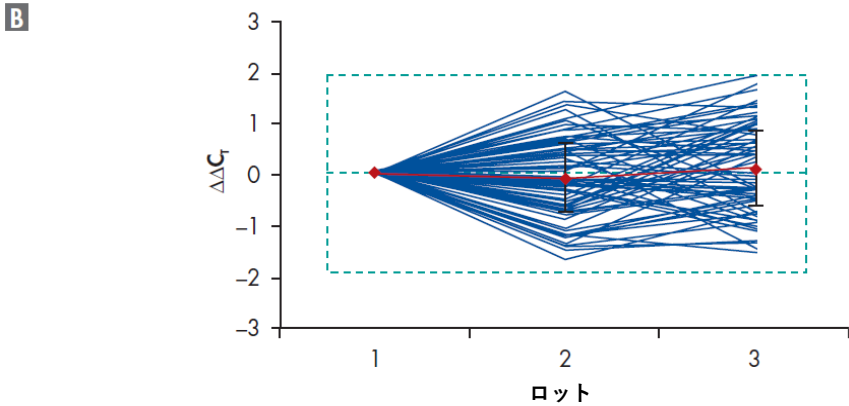
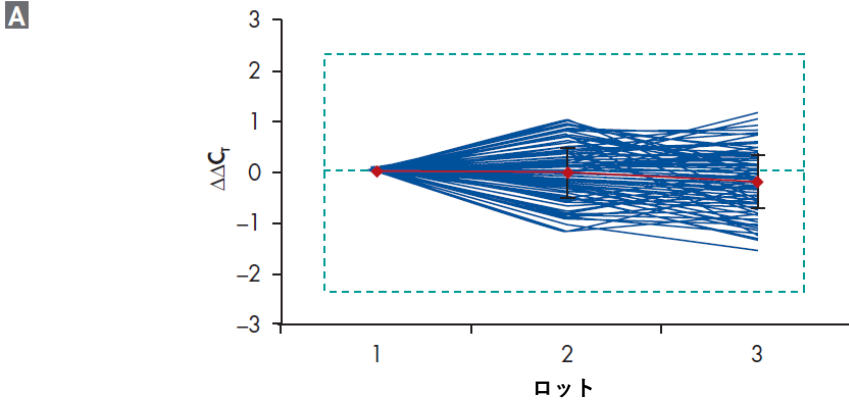
表 1D. 選択したドナープール（1、6、9、10）の全ロット間および全ユーザー間の再現性

データの組み合わせ	ドナープール 1 5.1 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 6 6.5 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	7.44	1.09	15	9.66	1.65	17
データの組み合わせ	ドナープール 9 8.4 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL			ドナープール 10 10.2 x 10 <sup>6</sup> 細胞/mL		
	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)	平均収量 (µg)	SD (µg)	CV (%)
ロット 1、全ユーザー	8.35	1.70	20	8.99	1.80	20

4 つの代表的なドナープールの詳細な分析です。白血球数に応じてプールを選択しました。プールは、白血球数の正常範囲（ $4.8 \times 10^6 \sim 1.1 \times 10^7$  白血球/mL）の上限値、平均値、下限値を反映しています。白血球数は、ドナープールあたりドナー3人の3つの白血球数の平均値を表します。



**図 8. RT-PCR の再現性 — ユーザー間。** 図 7 に示す実験で精製した RNA を、リアルタイム RT-PCR に使用。[A] FOS および [B] IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用するリアルタイム二重 RT-PCR により測定。ユーザー A の値 (10 ドナープール × 3 キットロット × 4 複製 = 各遺伝子に対し 120 データセット) と比較して全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値 (赤線) と標準偏差 (黒いバー) を示す。破線は、アッセイの合計精度の ±3 倍を示す (FOS : 2.34  $C_t$ ; IL1B: 1.93  $C_t$ )。



**図 9. RT-PCR の再現性** — キットロット間図 7 に示す実験で精製した RNA を、リアルタイム RT-PCR に使用。**[A]** FOS および **[B]** IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用するリアルタイム二重 RT-PCR により測定。キットロット 1 の値 (10 ドナープール × 3 ユーザー × 4 複製 = 各遺伝子に対し 120 データセット) と比較して全サンプルの値をプロットし、全サンプルの平均値 (赤線) と標準偏差 (黒いバー) を示す。破線は、アッセイの合計精度の ±3 倍を示す (FOS : 2.34 Ct; IL1B: 1.93 Ct)。

表 2. 図 8 および 9 の RT-PCR データの要約

テストシステム	FOS/18S rRNA アッセイ		IL1B/18S rRNA アッセイ	
	平均値 ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )	平均値 ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ SD ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>各ユーザー内および全ロット間の再現性</b>				
全ユーザー、ロット 1—ロット 1	0.00	0.00	0.00	0.00
全ユーザー、ロット 1—ロット 2	-0.03	0.48	-0.07	0.66
全ユーザー、ロット 1—ロット 3	-0.21	0.52	0.11	0.71
<b>各ユーザー内および全ロット間の再現性</b>				
全ロット、ユーザーA—ユーザーA	0.00	0.00	0.00	0.00
全ロット、ユーザーA—ユーザーB	-0.46	0.44	-0.06	0.69
全ロット、ユーザーA—ユーザーC	-0.31	0.60	-0.15	0.71

ユーザー：技師、試験を実施

ロット：本試験に使用したキットロット数

SD：標準偏差。

図 8 および 9 に提示するデータの平均 $\Delta\Delta C_T$  値 (N = 120) および標準偏差を示す。

## 自動化 RNA 精製

血液 RNA の精製は、QIAGEN QIAcube Connect MDx または従来の QIAGEN QIAcube（以下 QIAcube と呼称）で自動化されています。革新的な QIAcube 機器は、高度なテクノロジーを使用して QIAGEN スピンカラムを処理し、自動化した低スループットサンプル調製をラボのワークフローにシームレスに統合します。QIAcube 機器を使用するサンプル調製は、手動手順と同じステップ（溶解、結合、洗浄、溶出）をたどり、PAXgene Blood RNA Kit を引き続き使用して高品質 RNA を精製できます。



図 10.QIAcube Connect MDx

自動 RNA 精製プロトコルは、「PAXgene Blood RNA Part A」と「PAXgene Blood RNA Part B」の 2 つのパート（すなわちプロトコル）で構成され、この 2 つのパートの間に短時間の手動介入が入ります（32 ページの図 11 参照）。

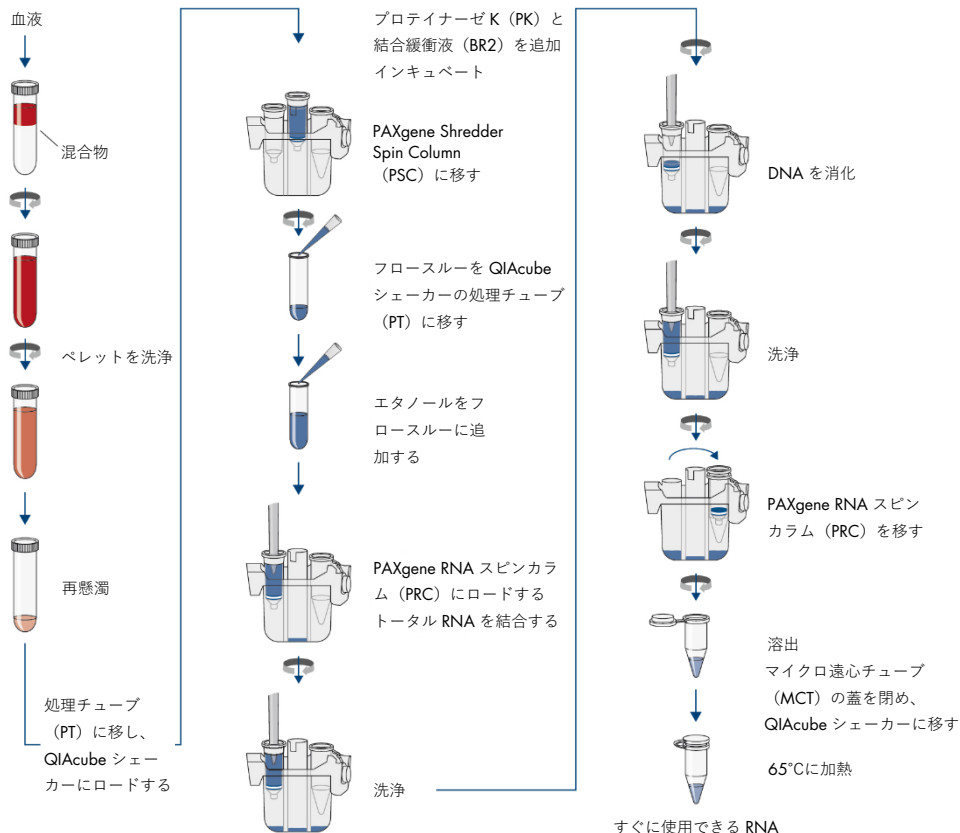


図 11. 自動化 PAXgene Blood RNA 手順

遠心分離、洗浄、再懸濁した核酸ペレット（20 ページの「RNA の濃縮と精製」を参照）を、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) から処理チューブ (PT) に移し、QIAcube 機器のワークテーブル上のサーモシェーカーユニットに入れます。オペレーターがメニューから「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコルを選択して開始します。QIAcube 機器は、溶出バッファー (BR5) に RNA を溶出するまでのプロトコルステップを実行します。オペレーターが、精製した RNA を含むマイクロ遠心チューブ (MCT) を QIAcube 機器のサーモシェーカーユニットに移します。オペレーターがメニューから「PAXgene Blood RNA Part B」プロトコルを選択して開始し、QIAcube 機器が熱変性を実行します。



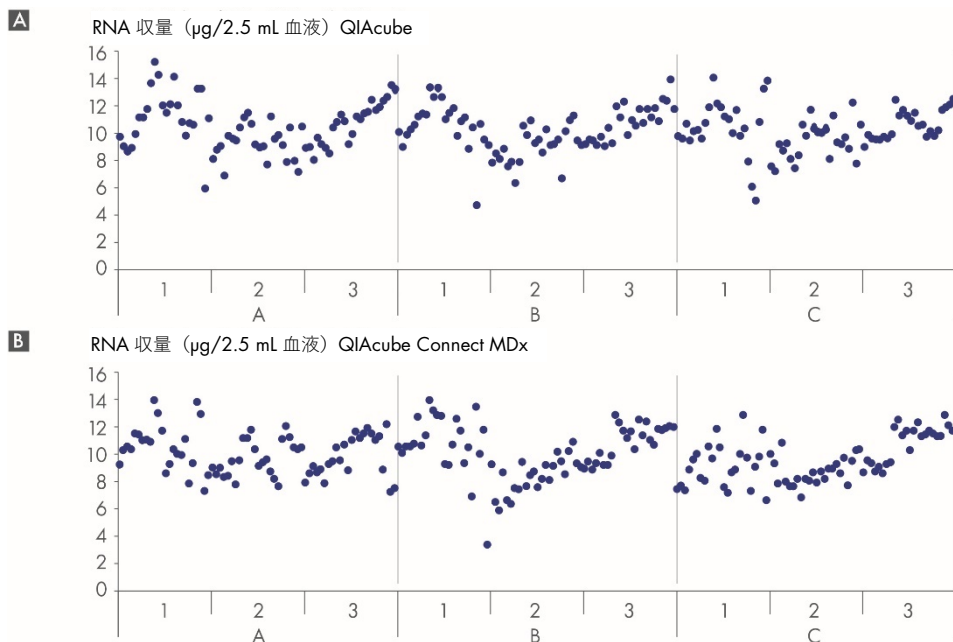
平均サンプル調製時間（サンプル調製 12 回のデータに基づく）は 151 分であり \*、手動プロトコールと比較して処理時間が大幅に短縮されます。

健康なヒト全血 2.5 mL からの RNA 収量は、処理したサンプルの 95%以上で 3 µg 以上です。図 12（34 ページ）は、オペレーター 3 人が 3 キットロットで自動プロトコールを使用して調製した合計 216 サンプルからの RNA 収量を示します。このような試験では、個々の PAXgene Blood RNA Tube（BRT）の代わりにプールした血液サンプルを使用したことで、結果は個々の採血の単一サンプルで期待される RNA 収量を反映していません。収量はドナーに大きく依存するため、個々の収量は異なる場合があります（34 ページの図 12）。

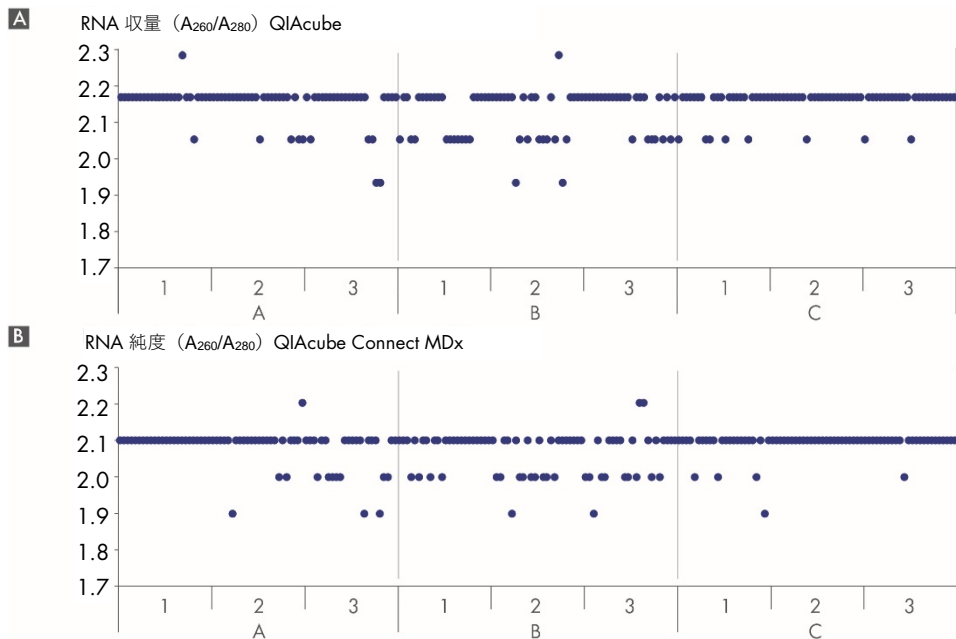
溶出液の最大 30%を使用すると、サンプルの少なくとも 95%は RT-PCR で阻害を示しません。自動プロトコールを使用し、RNA 陽性サンプル（ヒト全血）と RNA 陰性サンプル（水）をペアにして同じ実行時に、ABL1 と FOS 転写産物の配列の定量リアルタイム RT-PCR で測定すると、サンプル間のクロスコンタミネーションは検出できません。

RT-PCR 阻害がなく、 $A_{260}/A_{280}$  の値が 1.8~2.2 であることからわかるように、PAXgene Blood RNA System と自動プロトコールで分離した RNA は純粋です。ゲノム DNA は、ベータアクチン遺伝子配列の定量 real-time PCR で測定した場合、全サンプルの 95%以上に 1%以下 (w/w) 存在します。図 13 および 14（35 および 36 ページ）は、オペレーター 3 人が 3 キットロットを用いて自動プロトコールを使用して調製した合計 216 サンプルの  $A_{260}/A_{280}$  値および相対ゲノム DNA を示します。

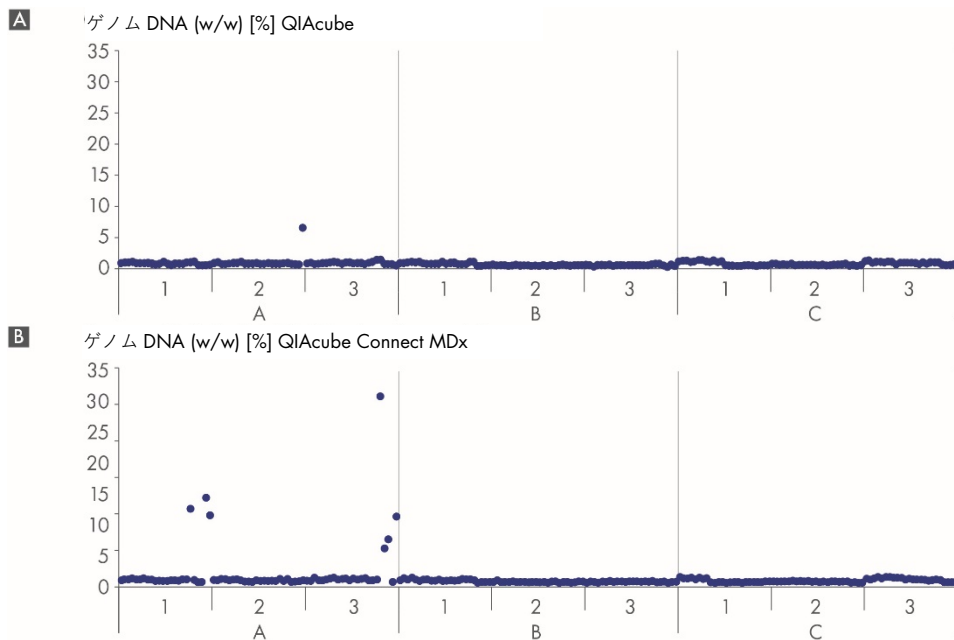
\* PAXgene Blood RNA Tube の事前処理（遠心分離、ペレット洗浄、ペレット再懸濁）を含むプロトコールの総実行時間。



**図 12.RNA 収量** — 自動処理 **A : QIAcube**、**B : QIAcube Connect MDx**.個々のドナーの血液サンプルを、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取。チューブの内容物を 6 つのドナープールにプールしてから、再分注。合計 216 チューブ (プールあたり 36) を異なるオペレーター3人 (A、B、C) が処理。各オペレーターは、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、複数の QIAcube および QIAcube Connect MDx 機器で自動抽出し、6 つのドナープールの各々から 4 重サンプルを処理。オペレーターとロットの全組み合わせに対して、すべての個々のサンプルの RNA 収量を示す。

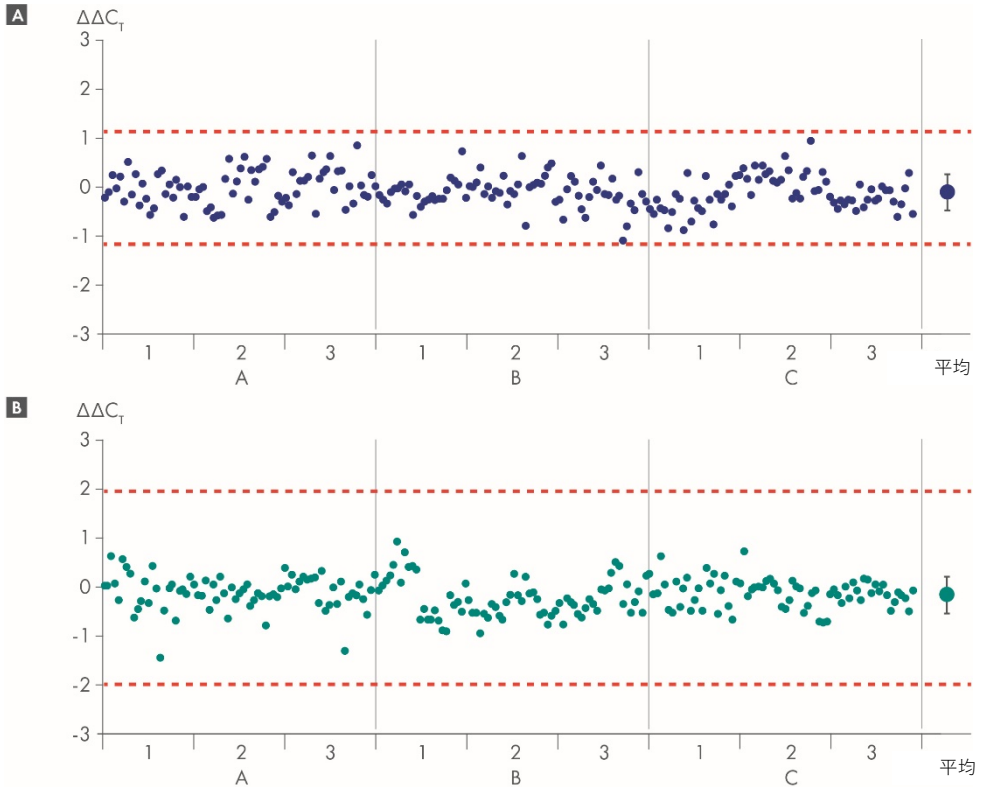


**図 13. RNA 純度 ( $A_{260}/A_{280}$  値) — 自動処理。** **A : QIAcube、B : QIAcube Connect MDx** RNA は、図 12 に示す実験で、複数の QIAcube および QIAcube Connect MDx 機器を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。すべてのオペレーターとロットの組み合わせに対して、個々のサンプルすべての  $A_{260}/A_{280}$  値を示す。

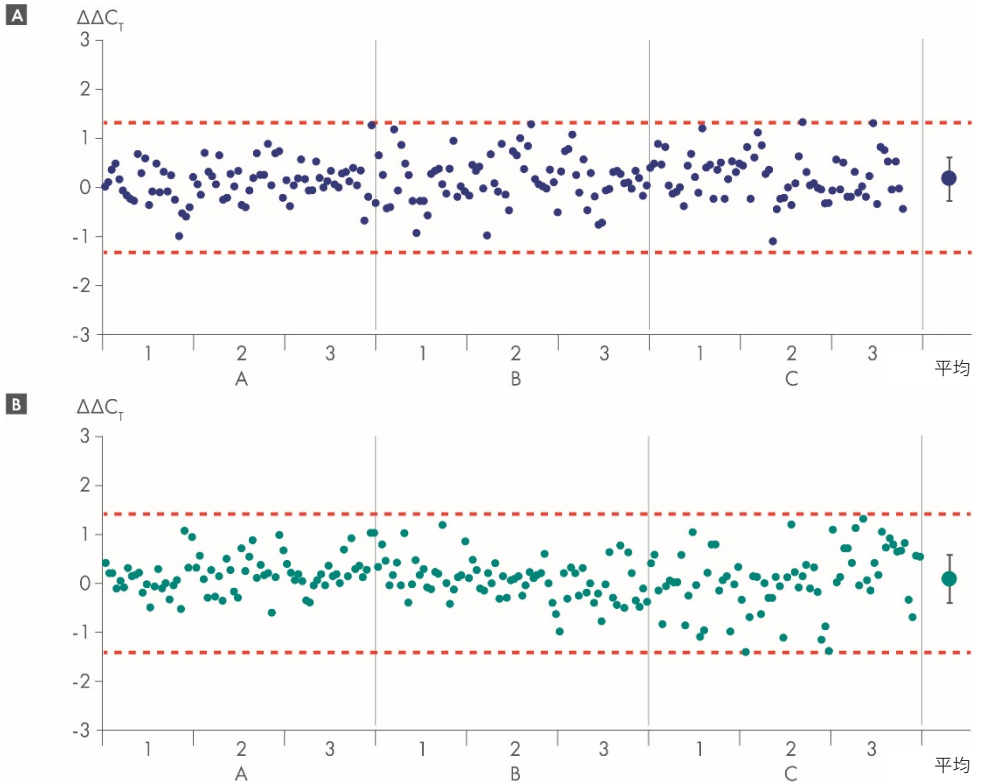


**図 14. RNA 純度 (%ゲノム DNA 汚染) — 自動処理、A : QIAcube、B : QIAcube Connect MDx** RNA は、図 12 に示す実験で、複数の QIAcube および QIAcube Connect MDx 機器を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。すべてのオペレーターとロットの組み合わせに対して、個々のサンプルすべてのゲノム DNA 量 (w/w) を示す。

PAXgene Blood RNA System を使用する RNA 精製の自動プロトコルでは、図 15 および図 16 (ページ 37 および 38) に示すように、再現性と反復性の高い RT-PCR 結果が得られ、臨床診断検査に対して非常にロバストです。



**図 15. RT-PCR の再現性** — 自動プロトコール (QIAcube) と手動プロトコールの間 RNA は、図 12 に示す実験で、自動プロトコールを使用し、複数の QIAcube および QIAcube Connect MDx 機器を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。並行して、手動プロトコールを使用して、対応する複製チューブから RNA を精製。**[A]** FOS および **[B]** IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用するリアルタイム二重 RT-PCR により測定。両方の抽出プロトコール (自動プロトコールと手動プロトコール) を使用して、ペアにした血液サンプルから調製した RNA 間の転写産物レベルの考えられる差は、 $\Delta\Delta C_T$  メソッドにより計算。全サンプルペア (4 複製  $\times$  6 ドナープール  $\times$  3 キットロット  $\times$  オペレーター 3 人 = 各遺伝子に対し 216 ペア) の個々の  $\Delta\Delta C_T$  値を、それぞれドットとしてプロットし、全サンプルの平均値 (大きなドット) と標準偏差 (黒いバー) を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍を示す (FOS : 1.16  $C_T$ ; IL1B : 1.98  $C_T$ ; アッセイのバージョンが異なるため、図 1~4、8、9 に比べ、アッセイの精度が異なる)。



**図 16. RT-PCR の再現性** — 自動プロトコルを使用した QIAcube と QIAcube Connect MDx の間。RNA は、図 12 に示す実験で、自動プロトコルを使用し、複数の QIAcube および QIAcube Connect MDx 機器を用いて、PAXgene Blood RNA Kit の 3 つの異なるロット (1、2、3) を使用して、異なるオペレーター 3 人 (A、B、C) が精製。**[A]** FOS および **[B]** IL1B の相対転写産物レベルを、内部標準として 18S rRNA を使用するリアルタイム二重 RT-PCR により測定。両方の機器を使用して、ペアにした血液サンプルから調製した RNA 間の転写産物レベルの考えられる差は、 $\Delta\Delta C_T$  メソッドにより計算。全サンプルペア (4 複製  $\times$  6 ドナープール  $\times$  3 キットロット  $\times$  オペレーター 3 人 = 各遺伝子に対し 216 ペア) の個々の  $\Delta\Delta C_T$  値を、それぞれドットとしてプロットし、全サンプルの平均値 (大きなドット) と標準偏差 (黒いバー) を示す。破線は、アッセイの合計精度の  $\pm 3$  倍を示す (FOS : 1.30  $C_T$ ; IL1B : 1.42  $C_T$ ; アッセイのバージョンが異なるため、図 1~4、8、9、15 に比べ、アッセイの精度が異なる)。

# ユーザーが準備する装置と試薬

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート（SDS）をご参照ください。

## すべてのプロトコール用

- PAXgene Blood RNA Tubes（BRT、PreAnalytiX、カタログ番号 762165）
- エタノール（96～100%、純度等級 p.a.）
- ピペット \*（10  $\mu$ L – 4 mL）
- 無菌、エアロゾルバリア、RNase フリーのピペットチップ †
- メスシリンダー ‡
- 3000～5000  $\times$  g を達成可能な遠心分離機\*。PAXgene Blood RNA Tube（BRT）保持用スイングアウトローターとバケットを搭載。
- ボルテックスミキサー\*
- 破碎氷片
- ラベル付け用油性ペン

## 手動プロトコール用

- 少なくとも 1000～8000  $\times$  g の範囲が可能な可変速マイクロ遠心機\*。ただし、これ以下およびこれ以上の g 力が適用可能であり（詳細についてはプロトコール手順参照）、2 mL マイクロ遠心チューブ用のローターが搭載されています。

\* デバイスおよび機器が製造者の推奨とおりに定期的に点検され、メンテナンスされ、校正されていることをご確認ください。

† RNA の取り扱いに関するガイドラインに精通していることをご確認ください（付録 A、75 ページ）。

‡ バッファ-BR4 濃縮物へのエタノール添加用

- 55° C および 65° C でインキュベートし、400 rpm 以上、1400 rpm を超えない範囲で振とう可能なシェーカーインキュベーター\*（例：Eppendorf® Thermomixer Compact または同等品）

### 自動プロトコール（QIAcube または QIAcube Connect MDx 使用）

- ハサミ

QIAcube 機器の消耗品：

- Filter-Tips、1000 µL (1024)（QIAGEN、カタログ番号 990352）†
- Reagent Bottle、30 mL（6）（QIAGEN、カタログ番号 990393）†
- Rotor Adapter（10 x 24）（QIAGEN、カタログ番号 990394）†

QIAcube 機器付属品：

- Rotor Adapter Holder（QIAGEN、カタログ番号 990392）†

### QIAcube Connect MDx を使用する自動プロトコール用

- QIAcube Connect MDx\*（QIAGEN、カタログ番号 9003070）

QIAcube Connect MDx サービスバンドル：

- QIAcube Connect MDx System FUL-2（QIAGEN、カタログ番号 9003071）
- QIAcube Connect MDx System FUL-3（QIAGEN、カタログ番号 9003072）
- QIAcube Connect MDx System PRV-1（QIAGEN、カタログ番号 9003073）
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1（QIAGEN、カタログ番号 9003074）
- QIAcube Connect MDx System PRM-1（QIAGEN、カタログ番号 9003075）

\* デバイスおよび機器が製造者の推奨とおりに定期的に点検され、メンテナンスされ、校正されていることをご確認ください。

† Starter Pack、QIAcube（QIAGEN、カタログ番号 990395）にも含まれています。



## QIAcube を使用する自動プロトコール用

- QIAcube\* (QIAGEN、カタログ番号 9001882 [110 V])

\* デバイスおよび機器が製造者の推奨とおりに定期的に点検され、メンテナンスされ、校正されていることをご確認ください。

# 重要な注意

## QIAcube 機器の使用

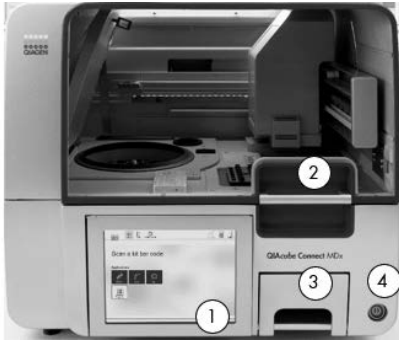
QIAcube 機器の操作に必ず精通してください。自動化 PAXgene Blood RNA プロトコールを開始する前に、安全情報に細心の注意を払いながら、適切な QIAcube 機器ユーザーマニュアルおよび QIAcube 機器に付属の追加情報をお読みください。

このセクションの指示は、別に指定されていない場合は、QIAcube Connect MDx と QIAcube に適用されます。

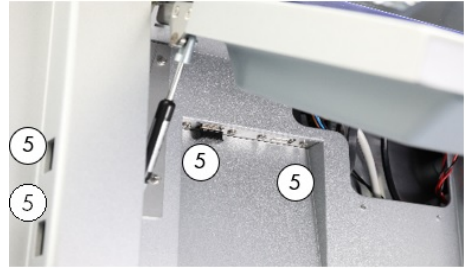
## QIAcube 機器の起動

QIAcube 機器フードを閉じ、電源スイッチで QIAcube 機器の電源を入れます（QIAcube Connect MDx：43 ページの図 17 参照; QIAcube：44 ページの図 18）。

ピープ音が鳴り、スタートアップ画面が表示されます。初期化テストが自動で実行されま



QIAcube Connect MDx の前面図



引き出したタッチスクリーン



図 17. QIAcube Connect MDx の外部機能。

- |   |  |
|---|--|
| <p>① タッチスクリーン</p> <p>② フード</p> <p>③ 廃棄物ドロワー</p> <p>④ 電源スイッチ</p> | <p>⑤ タッチスクリーンの左側に 2 個の USB ポート、タッチスクリーンの裏に 2 個の USB ポート (1 個の USB ポートに Wi-Fi モジュールのプラグを接続)</p> <p>⑥ RJ-45 イーサネットポート</p> <p>⑦ 電源コードソケット</p> <p>⑧ 冷却空気出口</p> |
|---|--|



図 18.QIAcube の前面図

- |   |   |   |                  |
|---|---|---|------------------|
| ① | タッチスクリーン  | ④ | 保護パネルの裏の USB ポート |
| ② | フード   | ⑤ | 電源スイッチ           |
| ③ | 保護パネルの裏の RS232 シリアルポート<br>(QIAGEN 機器サービス専門員のみが使用) | ⑥ | 廃棄物ドロワー          |

## タッチスクリーン

QIAcube 機器は、タッチスクリーンを使用して制御します。タッチスクリーンにより、ユーザーは機器を操作し、ワークテーブルをセットアップできます。サンプル処理中のタッチスクリーンには、プロトコルの状況と残り時間が表示されます。



図 19.引き出した QIAcube Connect MDx のタッチスクリーン

## QIAcube 機器にプロトコールをインストール

QIAcube 機器で初めて RNA 調製を行う前に、初期プロトコールをインストールしなければならない可能性があります。「PAXgene Blood RNA Part A」と「PAXgene Blood RNA Part B」の両プロトコールをインストールします。

QIAcube Connect MDx のプロトコールは、[www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources) (QIAcube は [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube)) で提供しています。QIAcube 機器に付属の USB スティックにダウンロードする必要があります。このプロトコールは、USB ポートを介して機器に転送されます。

USB ポート (QIAcube Connect Mdx: タッチスクリーンの側面にあります。43 ページの図 17 参照。QIAcube: 保護パネルの裏にあります。44 ページの図 18 参照) を使用すると、QIAcube 機器を QIAcube 機器付属の USB スティックに接続できます。ログファイルやレポートファイルなどのデータファイルも、USB ポート経由で、QIAcube 装置から USB スティックに転送できます。



この USB ポートは、QIAGEN が提供する USB スティックでしか使用できません。他のデバイスをこのポートに接続しないでください。



プロトコールダウンロード中やデータファイル転送中、またはプロトコール実行中は、USB スティックを取り外さないでください。

QIAcube 機器にプロトコールをアップロードするプロセスの詳細については、使用する機器の関連ハンドブックをご参照ください。

## QIAcube 機器をロード

時間を節約するには、65 ページの「プロトコール: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血からトータル RNA を自動精製」に示す 10 分間遠心分離ステップ (ステップ 3 と 5) の一方または両方でロードできます。

### 試薬ボトル

QIAcube 機器で実行する前に毎回、4 つの試薬ボトルに表 3 (47 ページ) に記載する試薬を、最大インジケーターレベルまで、またはそれが不可能な場合は PAXgene Blood RNA Kit が提供するバッファー量で可能なレベルまで、慎重に充填します。ボトルと蓋にバッファー名を明確にラベル表示し、充填した試薬ボトルを試薬ボトルラックの適切な位置にセットします。図のように、ラックを QIAcube 機器のワークテーブルにロードします (48~50 ページの図 20~22)。



供給されているバッファーBR2 の量では、試薬ボトルのインジケーターレベルまで満たすことができません。バッファーBR3 と BR4 は、前の実行で複数のサンプルを処理した後では、ボトルをインジケーターレベルまで満たさない場合があります。



ワークテーブルにセットする前に、必ずボトルから蓋を外してください。

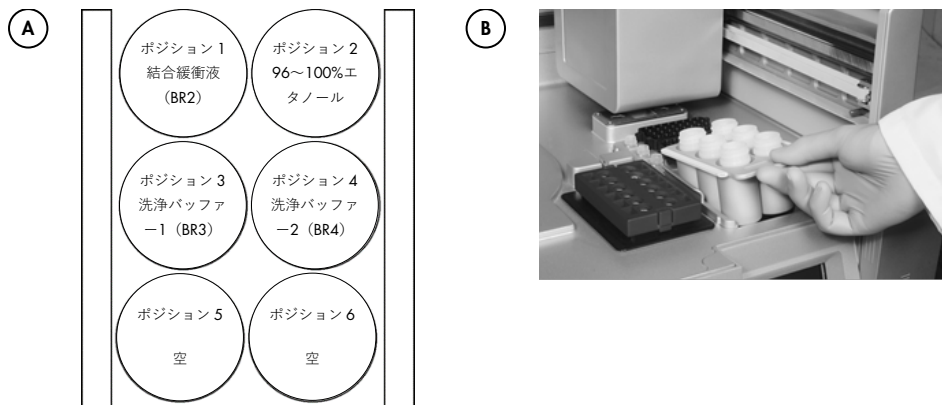


PAXgene Blood RNA Kit (50) が提供するバッファー量は、QIAcube 機器で最大 7 回の RNA 調製を実行するのに十分であり、1 回実行あたりのサンプル数は 2～12 です。一般に、最大 7 回の RNA 調製実行で、キットあたり合計 50 サンプルを処理するには、サンプル数が少ない実行は避ける必要があります。7 回を超える RNA 調製実行では、最後のサンプル処理に必要なバッファー量が不足する可能性があります。

表 3. 試薬ボトルラック内の位置

ポジション	試薬
1	結合緩衝液 (BR2)
2	96～100%エタノール
3	洗浄バッファー1 (BR3)
4	洗浄バッファー2 (BR4) *
5	- (空のままにする)
6	- (空のままにする)

\*洗浄バッファー2 (BR4) は、濃縮物として供給されます。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96～100%、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。



**図 20. 試薬ボトルラックをロード** [A] 試薬ボトルラック内のボトルの位置と内容の概略図。 [B] ラックを QIAcube 機器にロード (例として QIAcube を示す)。



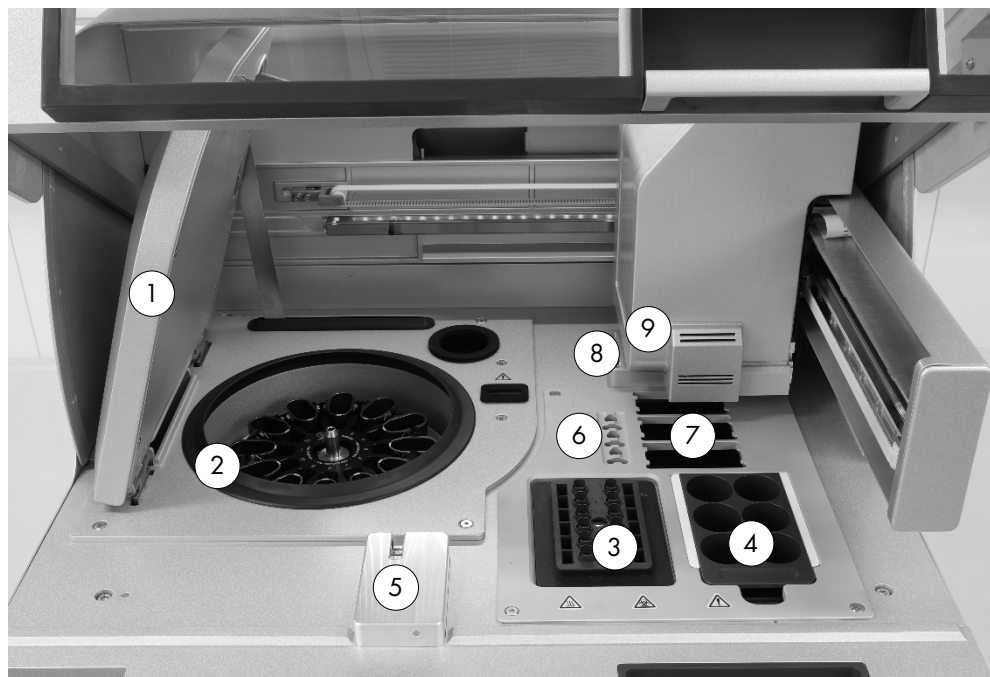


図 21. QIAcube Connect MDx の内部図。

- |  |   |
|--|---|
| <p>① 遠心分離機の蓋</p> <p>② 遠心分離機</p> <p>③ シェーカー</p> <p>④ 試薬ボトルラック</p> <p>⑤ チップセンサーおよびフードロック</p> | <p>⑥ マイクロ遠心チューブスロット</p> <p>⑦ チップラック用の 3 つのスロット</p> <p>⑧ チップおよびカラム用廃棄スロット</p> <p>⑨ ロボットアーム (1 個のチャネルピペッター、グリッパー、超音波および光学センサー、UV LED を含む)</p> |
|--|---|

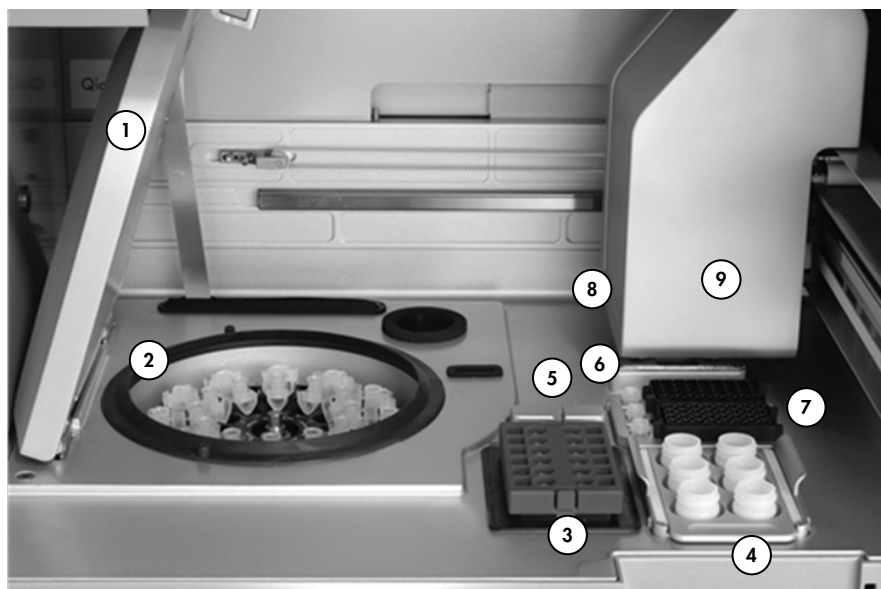


図 22.QIAcube の内部図。

- |   |          |   |                  |
|---|----------|---|------------------|
| ① | 遠心分離機の蓋  | ⑥ | マイクロ遠心チューブスロット   |
| ② | 遠心分離機    | ⑦ | チップラック           |
| ③ | シェーカー    | ⑧ | チップおよびカラム用廃棄スロット |
| ④ | 試薬ボトルラック | ⑨ | ロボットアーム          |
| ⑤ | チップセンサー  |   |                  |

スピнкаラム (PRC、PSC)、マイクロ遠心チューブ (MCT)、および QIAcube 機器プラスチック製品

フィルターチップ 1000  $\mu$ L を充填した 2 つのチップラックを QIAcube 機器にセットします (49 および 50 ページの図 21 および 22 参照)。必要に応じて、ラックにチップを補充します。



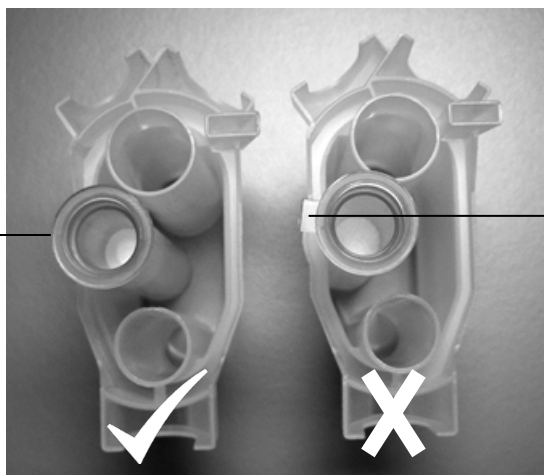
QIAcube 機器用に設計された 1000  $\mu$ L フィルターチップ以外、使用できません。

油性ペンを使用して、各サンプルのローターアダプターとマイクロ遠心チューブ (MCT) にラベルを付けます。使用する PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) を開き、ハサミで蓋を完全に切り取ります (51 ページの図 23 参照)。



QIAcube 機器のロボットグリッパーを適切に操作するには、蓋と、蓋と PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC、図 23 参照) を接続するすべてのプラスチック部品を完全に取り外します (切り取ります)。そうしないと、ロボットグリッパーがスピнкаラム (PSC、PRC) を適切にグリップできません。

カラムの蓋が正しく取り外されている



カラムの蓋が正しく取り外されておらず、蓋の一部がまだ残っている

図 23. PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) をロード PAXgene Shredder スピнкаラム (PSC) を、ローターアダプターの中央の位置にロード。カラムをロードする前に蓋を切り取る。

表 4 と図 24 に示すように、PAXgene RNA スピンカラム (PRC)、PAXgene Shredder スピンカラム (PSC、蓋なし、51 ページの図 23 参照)、およびラベル付きマイクロ遠心チューブを各ラベル付きローターアダプターの適切な位置にロードします。

**i** スピンカラム (PRC) とマイクロ遠心チューブ (MCT) の蓋が、ローターアダプターの端にあるスロットの底まで完全に押し込まれていることを確認してください。そうしないと、遠心分離中に蓋が壊れます。

表 4.ローターアダプターの実験器具

ポジション	試薬	蓋の位置
1	PAXgene RNA スピンカラム (赤色、PRC)	L1
2	PAXgene Shredder スピンカラム (紫色、PSC) (ローターアダプターにセットする前に蓋を切り取る)	-
3	マイクロ遠心チューブ (MCT) *	L3

\* PAXgene Blood RNA Kit に付属のマイクロ遠心チューブ (MCT; 1.5 ml) を使用する。

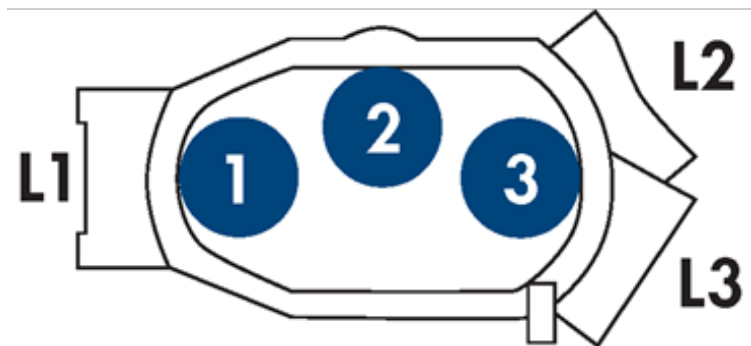


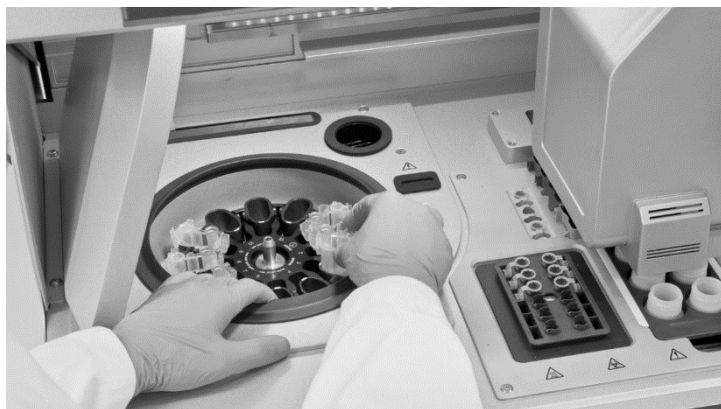
図 24.ローターアダプター内の位置ローターアダプターのチューブの位置は3つ (1~3)、蓋の位置も3つ (L1~L3) です。

## 遠心分離機のロード

下の図 25 に示すように、組み立てたローターアダプターを遠心分離機バケットにロードします。



処理するサンプルの数が 12 未満の場合は、必ず放射状にバランスの取れた遠心ローターをロードします (54 ページの図 26 参照)。処理するサンプルの数が 12 未満であっても、プロトコールの実行を開始する前にすべての遠心分離機バケットを取り付ける必要があります。単一 (1) サンプルまたは 11 サンプルは処理できません。



**図 25. QIAcube 機器に遠心分離機をロード**組み立てたローターアダプターを遠心分離機バケットにロードします (例として QIAcube Connect MDx を示す)。

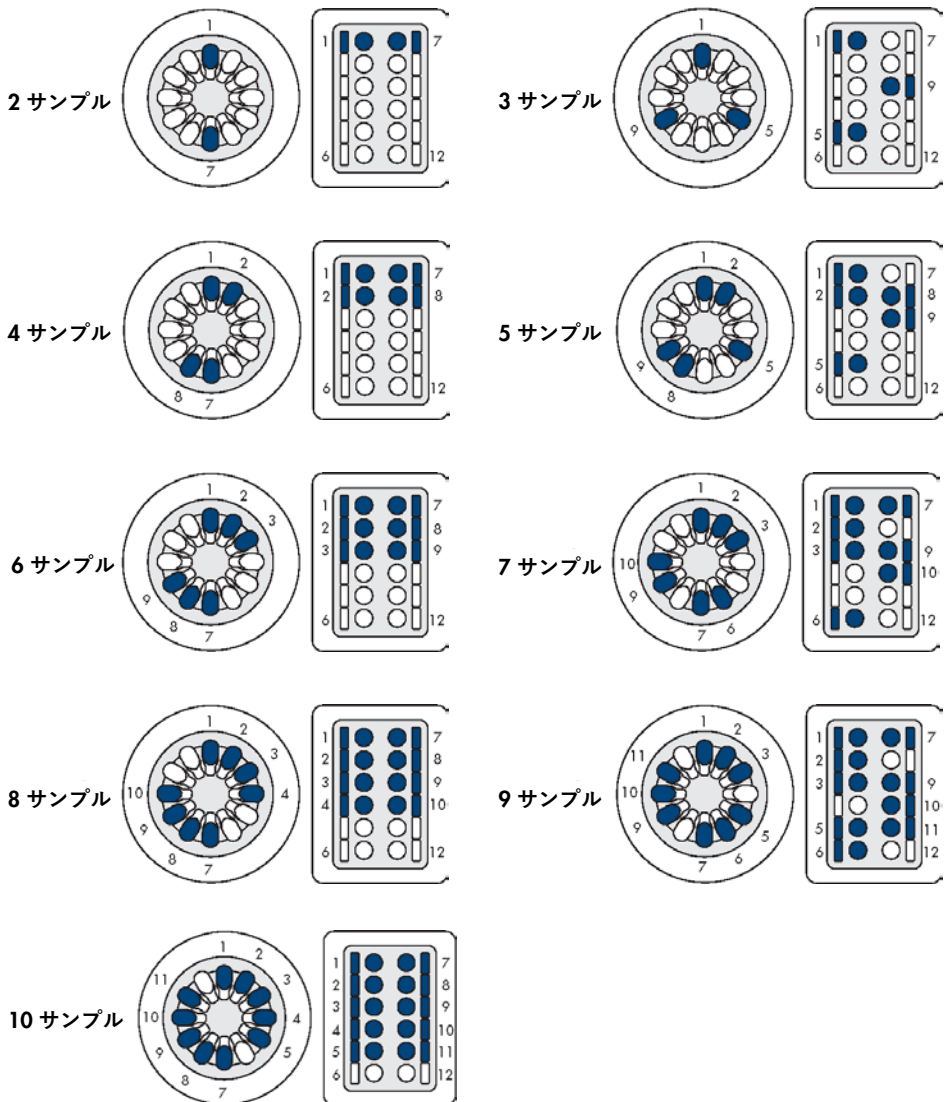


図 26.遠心分離機とシェーカーをロード 2~10 個のサンプルを処理する遠心分離機とシェーカーの位置を示す。1 個または 11 個のサンプルは処理できない。12 個のサンプルを処理するには、すべての遠心分離機とシェーカーの位置をロードする（画像非表示）。

## 処理チューブ (PT)

マイクロ遠心チューブスロットに残っている以前の実行の処理チューブ (PT) をすべて取り外します (QIAcube Connect MDx : 49 ページの図 21 参照、QIAcube : 50 ページの図 22 参照)。実行中のサンプル数に応じて、3 つの処理チューブ (PT) に表 5 に示す量の試薬を充填します。

DNase I インキュベーションミックスでは、指示された量の DNA 消化バッファー (RDD) を処理チューブ (PT) にピペットで移し、指示された量の DNase I (RNFD) 保存溶液を加えます。1000  $\mu$ L ピペットチップを使用して、混合物全体を 3 回上下に静かにピペット操作して混合します。

PAXgene Blood RNA Kit に付属の 2 mL 処理チューブ (PT) を使用します。表 6 (56 ページ) に示すように、チューブに試薬名を明確にラベル付けし、マイクロ遠心チューブスロットの適切な位置に取り付けます。



DNase I (RNFD) は、物理的変性に特に敏感です。ピペット操作のみで混合し、ワイドボアピペットチップを使用してせん断を減らします。ボルテックスしないでください。



以下の表 5 に示すように、必ず必要な量だけをピペットで移してください。

表 5. マイクロ遠心チューブスロット用処理チューブに必要な試薬量

サンプル数	指定サンプル数に対する試薬量 (μL)		
	プロテイナーゼ K (PK)	DNase I インキュベーションミックス	溶出バッファー (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 バッファー-RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 バッファー-RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 バッファー-RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 バッファー-RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 バッファー-RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 バッファー-RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 バッファー-RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 バッファー-RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 バッファー-RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 バッファー-RDD)	1177

表 6. マイクロ遠心チューブスロット

	ポジション		
	A	B	C
内容	プロテイナーゼ K	DNase I インキュベーションミックス	溶出バッファー (BR5)
容器	処理チューブ (PT) *	処理チューブ (PT) *	処理チューブ (PT) *

\* PAXgene Blood RNA Kit に含まれる 2 mL 処理チューブを使用する。



# プロトコール: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血からトータル RNA を手動精製

## はじめる前の重要な留意点

- キットボックスがインタクトで、損傷がないこと、バッファーが漏れていないことを確認します。破損したキットは使用しないでください。
- ピペットを使用するときは、ピペットが正しい容量に設定されていること、液体が注意深く完全に吸引され、分注されていることを確認してください。
- サンプルを間違ったチューブやスピнкаラムに移さないようにするため、油性ペンを使用してすべてのチューブとスピнкаラムに適切なラベルを付けます。各チューブ (PT、MCT) の蓋と本体にラベルを付けます。スピнкаラムの場合は、処理チューブ (PT) の本体にラベルを付けます。液体をチューブまたはスピнкаラムに移してから、閉じます。
- 手順中にサンプルやバッファーがこぼれると、RNA の収量と純度が低下する可能性があります。
- 特に明記されていない限り、遠心分離ステップを含むこのプロトコールのすべてのステップは、室温 (15~25° C) で実行する必要があります。

核酸増幅技術は感度が高いため、サンプルを取り扱う際には、クロスコンタミネーションを避けるために以下の予防措置が必要となります。

- カラムの縁を湿らせないように、ピペットでサンプルをスピнкаラム (PRC、PSC) に注意深く移します。
- 液体を移すたびにピペットチップを交換します。エアロゾルバリアーピペットチップを使用します。
- ピペットチップでスピнкаラム (PRC、PSC) メンブレンに触れないでください。

- マイクロ遠心チューブ (MCT) をボルテックスまたは加熱した後、短時間遠心分離して蓋の内側から滴を取り除きます。
- 手順全体にわたり手袋を着用します。手袋とサンプルが接触した場合は、すぐに手袋を交換します。
- スピнкаラム (PRC、PSC) を閉じてから、マイクロ遠心機にセットします。手順の説明に従って遠心分離します。
- 一度に 1 つのスピнкаラム (PRC、PSC) のみを開き、エアロゾルが発生しないように注意します。
- 複数のサンプルを効率的に並行処理するには、処理チューブ (PT) をラックに充填し、遠心分離後に、そこにスピнкаラム (PRC、PSC) を移します。フロースルーを含む使用済みの処理チューブ (PT) を廃棄し、スピнкаラム (PRC、PSC) を含む新しい処理チューブ (PT) をマイクロ遠心機に直接セットします。

#### はじめる前に


- *PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックの指示に従って、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* に血液を採取する必要があります。必要に応じて、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* の取り扱いに関する推奨事項について、付録 C (78 ページ) をご参照ください。
- 採血後、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* を室温で少なくとも 2 時間インキュベートして、確実に血球を完全に溶解させます。*PAXgene Blood RNA Tube (BRT)* を夜間にわたりインキュベートすると、収量が増える可能性があります。採血後、*PAXgene Blood RNA Tube (BRT)* を 2~8° C、-20° C、または-70° C で保存した場合は、まず室温に平衡化し、次に室温で 2 時間保存してから、手順を開始します。
- 10 ページの安全情報をお読みください。
- RNA の取り扱いに関するガイドラインをお読みください (75 ページの付録 A)。
- ピペットやシェーカーインキュベーターなどの機器が、製造者の推奨とおりに定期的に点検され、校正されていることを確認します。
- シェーカーインキュベーターは手順 5 と 20 で必要です。シェーカーインキュベーターの温度を 55° C に設定します。


- 結合緩衝液 (BR2) は、保存時に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、37°Cに温めて溶解します。
- 洗浄バッファー2 (BR4) は濃縮されています。初めて使用するときは事前に、ボトルの表示に従って、4 倍量のエタノール (96~100%、純度等級 p.a.) を加えて作業溶液を調製します。
- RNase フリーDNase セットを初めて使用する場合は、DNase I 保存液を調製します。固体 DNase I (RNFD; 1500 Kunitz ユニット) \*を、セットに付属の DNase 再懸濁バッファー (DRB) 550 µL に溶解します。バイアルを開けるときに DNase I (RNFD) が消失しないように注意します。再構成した DNase I (RNFD) をボルテックスしないでください。DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、バイアルの反転でのみ、やさしく行ってください。
- 現在のデータによると、再構成した DNase I (RNFD) は 2~8°Cで最大 6 週間保存できます。DNase I (RNFD) の長期保存には、ガラスバイアルから保存液を取り出し、一回分の分量に分けます (キットに付属の 1.5 mL マイクロ遠心チューブ[MCT]を使用します。5 回分で十分)。-20° C で最大 9 か月保存できます。解凍した分量は 2~8° C で最大 6 週間保存できます。解凍した分量を再度冷凍しないでください。
- DNase I (RNFD) を再構成し、分取するときは、RNA の取り扱いに関するガイドライン (75 ページの付録 A) に必ず従います。

\* Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25° C、pH5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の  $A_{260}$  増加を引き起こす DNaseI の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J.Gen.Physiol.**33**, 349 および 363)。

## 操作手順

1. スイングアウトローターを使用して、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) を 3000～5000 x g で 10 分間遠心分離します。


 血球を完全に溶解させるには、血液サンプルを PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で室温 (15～25° C) にて確実に最低 2 時間インキュベートします。

 ローターには、丸底チューブ用のチューブアダプターが含まれている必要があります。別のタイプのチューブアダプターを使用すると、遠心分離中にチューブが破損する可能性があります。


2. デカンテーションまたはピペット操作により上清を除去します。ペレットに RNase フリー水 (RNFW) 4 mL を加え、新しい二次 BD Hemogard クロージャ (キットに付属) を使用してチューブを閉じます。

上清をデカンテーションする場合は、ペレットを乱さないように注意し、きれいなペーパータオルでチューブの縁を乾かします。


3. ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスし、スイングアウトローターを使用して 3000～5000 x g で 10 分間遠心分離します。上清全体を取り除き、廃棄します。ボルテックス後、遠心分離前に上清に残っている小さな破片は、手順に影響を与えません。

 上清の除去が不完全な場合、溶解が阻害され、溶解物が希釈されるため、RNA が PAXgene メンブレンに結合する条件に影響を与えます。


4. 再懸濁バッファー (BR1) 350  $\mu$ L を加え、ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスします。
5. ピペットでサンプルを 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) に移します。結合緩衝液 (BR2) 300  $\mu$ L とプロテイナーゼ K (PK) 40  $\mu$ L を加えます。5 秒間ボルテックスして混合し、シェーカーインキュベーターを使用して 400～1400 rpm、55°C で 10 分間インキュベートします。インキュベーション後、シェーカーインキュベーターの温度を 65° C に設定します (ステップ 20)。

 結合緩衝液 (BR2) とプロテイナーゼ K (PK) を、サンプルに加える前に混合しないでください。


6. 2 mL の処理チューブ (PT) にセットした PAXgene Shredder スピンカラム (PSC、紫色) に溶解物を直接ピペットで移し、最高速度 (ただし、 $20,000 \times g$  を超えない) で 3 分間遠心分離します。

 溶解物をスピカラム (PSC) に注意深くピペットで移し、溶解物がスピカラム (PSC) に完全に移動したことを目視確認します。


カラム (PSC) とチューブ (PT) の損傷を防ぐために、 $20,000 \times g$  を超えないでください。

 一部のサンプルは、遠心分離することなく PAXgene Shredder スピカラム (PSC) を通過することがあります。これはサンプルの粘度が低いためであり、製品の故障を示すものと見なしてはなりません。

7. フロースルー画分の上清全体を、処理チューブ内のペレットを乱さないように、新しい 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) に慎重に移します。
8. エタノール (96~100%、純度グレード p.a.) 350  $\mu\text{L}$  を加えます。ボルテックスして混合し、短時間遠心分離して ( $500 \sim 1000 \times g$  で 1~2 秒)、チューブの蓋の内側から滴を取り除きます。

 遠心分離時間は 1~2 秒を超えてはなりません。超えると、核酸がペレット化し、トータル RNA の収量が減少する可能性があります。

9. 2 mL の処理チューブ (PT) にセットした PAXgene RNA スピカラム (PRC、赤色) にサンプル 700  $\mu\text{L}$  をピペットで移し、 $8000 \sim 20,000 \times g$  で 1 分間遠心分離します。スピカラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。
10. ピペットで残りのサンプルを PAXgene RNA スピカラム (PRC) に移し、 $8000 \sim 20,000 \times g$  で 1 分間遠心分離します。スピカラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。

 ピペットでサンプルを注意深くスピカラム (PRC) に移し、サンプルが完全にスピカラム (PRC) に移ったことを目視確認します。

11. ピペットで洗浄バッファー1 (BR3) 350  $\mu$ L を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) に移します。8000~20,000  $\times g$  で1分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。

12.1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) 内の DNA 消化バッファー (RDD) 70  $\mu$ L に DNase I (RNFD) 保存液 10  $\mu$ L を加えます。チューブをさっと振って混合し、短時間遠心分離し、残留液をチューブ側面から回収します。

たとえば10サンプルを処理する場合は、DNase I (RNFD) 保存液 100  $\mu$ L を DNA 消化バッファー (RDD) 700  $\mu$ L に加えます。キットに付属の1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) を使用します。



DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、チューブをさっと振るだけで、やさしく行ってください。ボルテックスしないでください。

13. DNase I (RNFD) インキュベーションミックス (80  $\mu$ L) を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) メンブレンに直接ピペットで移し、ベンチトップ (20~30° C) に15分間置きます。



DNase I (RNFD) インキュベーションミックスがメンブレンに直接セットされていることを確認します。混合物の一部が壁やスピнкаラム (PRC) のオリングに付いて残っていると、DNase 消化は不完全になります。

14. ピペットで洗浄バッファー1 (BR3) 350  $\mu$ L を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) に移し、8000~20,000  $\times g$  で1分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。

15. ピペットで洗浄バッファー2 (BR4) 500  $\mu$ L を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) に移し、8000~20,000  $\times g$  で1分間遠心分離します。スピнкаラム (PRC) を新しい2 mL 処理チューブ (PT) にセットし、フロースルーを含む古い処理チューブ (PT) を廃棄します。



洗浄バッファー2 (BR4) は濃縮されています。使用する前に、エタノールが洗浄バッファー2 (BR4) に追加されていることをご確認ください (58ページの「はじめる前に」参照)。

16. さらに洗浄バッファー2 (BR4) 500  $\mu$ L を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) に追加します。8000~20,000  $\times$  g で 3 分間遠心分離します。

17. フロースルーを含む処理チューブ (PT) を廃棄し、PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) を新しい 2 mL 処理チューブ (PT) にセットします。8000~20,000  $\times$  g で 1 分間遠心分離します。

18. フロースルーを含む処理チューブを廃棄します。PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) を 1.5 mL マイクロ遠心チューブ (MCT) にセットし、ピペットで溶出バッファー (BR5) 40  $\mu$ L を PAXgene RNA スピнкаラム (PRC) メンブレンに直接移します。8000~20,000  $\times$  g で 1 分間遠心分離し、RNA を溶出します。

最大の溶出効率を達成するには、メンブレン全体を溶出バッファー (BR5) で湿らせることが重要です。

19. 溶出バッファー (BR5) 40  $\mu$ L と同じマイクロ遠心チューブ (MCT) を使用して、記載通りに溶出ステップ (ステップ 18) を繰り返します。

20. 溶出液をシェーカーインキュベーター (ステップ 5 から) で 65° C、5 分間、振とうせずにインキュベートします。インキュベーション後、すぐに氷上で冷却します。

このように 65° C でインキュベートすると、RNA が変性し、ダウンストリームアプリケーションに使用できます。インキュベーション時間または温度を超えないでください。

21. RNA サンプルをすぐに使用しない場合は、-20° C または -70° C で保存します。

凍結融解を繰り返しても RNA は変性したままなので、65° C でインキュベーションを繰り返す必要はありません。診断アッセイで RNA サンプルを使用する場合は、製造者の指示に従ってください。

260 nm の吸光度で RNA を正確に定量するには、サンプルを 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で希釈することをお勧めします。\* サンプルを RNase フリー水で希釈すると、値が不正確に低くなる可能性があります。

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。

測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー（BR5）と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー（BR5）は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。



Tris HCl バッファーでの定量には、 $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g}/\text{mL}$  の関係を使用します。76 ページの付録 B 参照。



# プロトコール: PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) に採取したヒト全血からトータル RNA を自動精製

## はじめる前の重要な留意点

- キットボックスがインタクトで、損傷がないこと、バッファーが漏れていないことを確認します。破損したキットは使用しないでください。
- ピペットを使用するときは、ピペットが正しい容量に設定されていること、液体が注意深く完全に吸引され、分注されていることを確認してください。
- サンプルを間違ったチューブやプラスチック消耗品に移さないよう、すべての処理チューブ (PT)、マイクロ遠心チューブ (MCT)、ローターアダプターに、油性ペンを使用して適切なラベルを付けます。各マイクロ遠心チューブ (MCT) の蓋と本体、各処理チューブ (PT) の本体、各ローターアダプターの外壁にラベルを付けます。
- 手順中にサンプルやバッファーがこぼれると、RNA の収量と純度が低下する可能性があります。
- 特に明記されていない限り、遠心分離ステップを含むこのプロトコールのすべてのステップは、室温 (15~25° C) で実行する必要があります。

核酸増幅技術は感度が高いため、サンプルを取り扱う際には、クロスコンタミネーションを避けるために以下の予防措置が必要となります。

- チューブの縁を湿らせないように、ピペットでサンプルを慎重に処理チューブ (PT) に移します。
- 液体を移すたびにピペットチップを交換します。エアロゾルバリアーピペットチップを使用します。
- ピペットチップでスピンカラム (PRC、PSC) メンブレンに触れないでください。

- マイクロ遠心チューブ (MCT) をボルテックスまたは加熱した後、短時間遠心分離して蓋の内側から滴を取り除きます。
- 手順全体にわたり手袋を着用します。手袋とサンプルが接触した場合は、すぐに手袋を交換します。

## はじめる前に

- *PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックの指示に従って、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* に血液を採取する必要があります。必要に応じて、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* の取り扱いに関する推奨事項について、付録 C (78 ページ) をご参照ください。
- 採血後、*PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)* を室温で少なくとも 2 時間インキュベートして、確実に血球を完全に溶解させます。*PAXgene Blood RNA Tube (BRT)* を夜間にわたりインキュベートすると、収量が増える可能性があります。採血後、*PAXgene Blood RNA Tube (BRT)* を 2~8° C、-20° C、または-70° C で保存した場合は、まず室温に平衡化し、次に室温で 2 時間保存してから、手順を開始します。
- 10 ページの安全情報をお読みください。
- 42 ページの「重要な注意」をお読みください。
- RNA の取り扱いに関するガイドラインをお読みください (75 ページの付録 A)。
- 安全情報に注意を払いながら、適切な *QIAcube* 機器のユーザーマニュアルおよび *QIAcube* 機器に付属の追加情報をお読みください。
- ピペットや *QIAcube* 機器などのデバイスと機器が、製造者の推奨事項に従って定期的に点検され、校正されていることをご確認ください。
- 結合緩衝液 (BR2) は、保存時に沈殿物を形成することがあります。必要に応じて、37°C に温めて溶解します。
- 洗浄バッファー-2 (BR4) は濃縮されています。初回使用時は、ボトルの表示に従い、適切な量のエタノール (96 ~ 100 %、純度等級 p.a.) を加え、作業溶液を調製します。

- RNase フリー-DNase セットを初めて使用する場合は、DNase I 保存液を調製します。固体 DNase I (RNFD、1500 Kunitz ユニット) \*を、セットに付属の DNase 再懸濁バッファー (DRB) 550  $\mu$ L に溶解します。バイアルを開けるときに DNase I (RNFD) が消失しないように注意します。再構成した DNase I (RNFD) をボルテックスしないでください。DNase I は物理的変性に特に敏感です。混和は、バイアルの反転でのみ、やさしく行ってください。
- 現在のデータによると、再構成した DNase I (RNFD) は 2~8°C で最大 6 週間保存できます。DNase I (RNFD) の長期保存には、ガラスバイアルから保存液を取り出し、一回分の分量に分けます (キットに付属の 1.5 mL マイクロ遠心チューブ [MCT] を使用します。5 回分で十分)。-20°C で最大 9 か月保存できます。解凍した分量は 2~8°C で最大 6 週間保存できます。解凍した分量を再度冷凍しないでください。
- DNase I (RNFD) を再構成し、分取するときは、RNA の取り扱いに関するガイドライン (75 ページの付録 A) に必ず従います。
- 正しいシェーカーアダプター (QIAcube 機器に付属。「2」のマークが付いた 2 mL セーフロックチューブ用のアダプターを使用) を取り付け、シェーカーラックをアダプターの上にセットします。
- 廃棄物ドロワーを点検し、必要に応じて空にします。
- 以前の実行でまだインストールされていない場合は、関連するプロトコルをすべてインストールします。QIAcube Connect MDx では、関連する zip ファイルにあるすべてのプロトコルをダウンロードする必要があります。従来の QIAcube では、「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコルと「PAXgene Blood RNA Part B」プロトコルの両方をインストールします。45 ページの「QIAcube 機器にプロトコルをインストール」参照。

## 操作手順

1. QIAcube 機器フードを閉じ、電源スイッチで QIAcube 機器の電源を入れます (QIAcube Connect MDx : 43 ページの図 17 参照、QIAcube : 44 ページの図 18 参照)。

\* Kunitz ユニットは、DNase I 測定に一般的に使用される単位であり、基質として高度に重合した DNA を使用して、25°C、pH5.0 で、1 ミリリットル当たり毎分 0.001 の  $A_{260}$  増加を引き起こす DNase I の量と定義されます (Kunitz, M. (1950) J.Gen.Physiol.**33**, 349 および 363)。

ピープ音が鳴り、スタートアップ画面が表示されます。初期化テストが自動で実行されます。

2. QIAcube 機器フードを開き、必要な試薬とプラスチック製品を QIAcube 機器にロードします。46 ページの「QIAcube 機器をロード」参照。

時間を節約するには、10 分間遠心分離ステップ（ステップ 3 と 5）の一方または両方でロードできます。

3. スイングアウトローターを使用して、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) を 3000~5000 x g で 10 分間遠心分離します。



血球を完全に溶解させるには、血液サンプルを PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で室温 (15~25° C) にて確実に最低 2 時間インキュベートします。



ローターには、丸底チューブ用のチューブアダプターが含まれている必要があります。別のタイプのチューブアダプターを使用すると、遠心分離中にチューブが破損する可能性があります。

4. デカンテーションまたはピペット操作により上清を除去します。ペレットに RNase フリー水 (RNFw) 4 mL を加え、新しい二次 BD Hemogard クロージャー (キットに付属) を使用してチューブを閉じます。

上清をデカンテーションする場合は、ペレットを乱さないように注意し、きれいなペーパータオルでチューブの縁を乾かします。

5. ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスし、スイングアウトローターを使用して 3000~5000 x g で 10 分間遠心分離します。上清全体を取り除き、廃棄します。ボルテックス後、遠心分離前に上清に残っている小さな破片は、手順に影響を与えません。



上清の除去が不完全な場合、溶解が阻害され、溶解物が希釈されるため、RNA が PAXgene メンブレンに結合する条件に影響を与えます。

6. 再懸濁バッファー (BR1) 350 µL を加え、ペレットの溶解が目視できるまでボルテックスします。
7. ピペットでサンプルを 2 mL の処理チューブ (PT) に移します。



PAXgene Blood RNA Kit に付属の 2 mL 処理チューブ (PT) を使用します。

8. サンプルを含むオープン処理チューブ (PT) を QIAcube 機器シェーカーにロードします (QIAcube Connect Mdx : 49 ページの図 21 参照、QIAcube : 50 ページの図 22 参照)。サンプルの位置には、ロードしやすいように番号をふっています。シェーカーラックプラグ (QIAcube 機器に付属) を、各処理チューブの隣のシェーカーラックの端にあるスロットに挿入します。これにより、ロード点検中にサンプルを検出できます。



正しいシェーカーアダプター (シェーカーアダプター、2 mL、セーフロックチューブ、「2」のマーク付き、QIAcube 機器に付属) が取り付けられていることを確認します。



処理するサンプルが 12 未満の場合は、54 ページの図 26 に示すように、必ずシェーカーラックをロードします。1 個または 11 個のサンプルは処理できません。シェーカーラックの位置番号は、遠心分離機の位置番号に対応しています。

9. QIAcube の機器フードを閉じます (QIAcube Connect Mdx : 43 ページの図 17 参照 ; QIAcube : 44 ページの図 18 参照)。
10. 「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコルを選択し、プロトコルを開始します。QIAcube 機器のタッチスクリーンに表示される指示に従います。



両方のプログラムパート (パート A とパート B) が QIAcube 機器にインストールされていることを確認します (45 ページの「QIAcube 機器にプロトコルをインストール」参照)。



QIAcube 機器は、サンプル、チップ、ローターアダプター、試薬ボトルのロードを点検します。

11. 「PAXgene Blood RNA Part A」プロトコル終了後、QIAcube 機器フードを開きます (QIAcube Connect Mdx : 43 ページの図 17 参照、QIAcube : 44 ページの図 18 参照)。ローターアダプターから PAXgene RNA スピニングカラム (PRC) を取り外し廃棄し、シェーカーから空の処理チューブ (PT) を取り外し廃棄します。



実行中、スピнкаラムは機器によってローターアダプター位置 1（蓋位置 L1）からローターアダプター位置 3（蓋位置 L2）に移動します（52 ページの図 24 参照）。

12. ローターアダプター中の精製 RNA を含むすべての 1.5 mL マイクロ遠心チューブ（MCT）の蓋を閉じます（位置 3、蓋位置 L3、52 ページの図 24 参照）。1.5 mL マイクロ遠心チューブ（MCT）を QIAcube 機器シェーカーアダプターに移します（QIAcube Connect Mdx：49 ページの図 21 参照；QIAcube：50 ページの図 22 参照）。
13. QIAcube の機器フードを閉じます（QIAcube Connect Mdx：43 ページの図 17 参照；QIAcube：44 ページの図 18 参照）。
14. 「PAXgene Blood RNA Part B」プロトコルを選択し、プロトコルを開始します。  
QIAcube 機器のタッチスクリーンに表示される指示に従います。



このプログラムは、サンプルを 65° C でインキュベートし、ダウンストリームアプリケーション用に RNA を変性させます。ダウンストリームアプリケーションに熱変性ステップが含まれている場合でも、このステップを省略しないでください。ダウンストリームアプリケーションで最大効率を得るには、十分な RNA 変性が不可欠です。

15. 「PAXgene Blood RNA Part B」プロトコル終了後、QIAcube 機器フードを開きます（QIAcube Connect Mdx：43 ページの図 17 参照；QIAcube：44 ページの図 18 参照）。  
精製した RNA が入ったマイクロ遠心チューブ（MCT）を直ちに氷上にセットします。



警告：高温表面。シェーカーの温度は最高 70° C（158° F）に達することがあります。熱い場合に触れないようにしてください。



精製した RNA を QIAcube 機器に残さないでください。サンプルを冷却していないので、精製した RNA が分解する可能性があります。したがって、夜間にわたるの無人サンプル調製はお勧めしません。

16. RNA サンプルをすぐに使用しない場合は、 $-20^{\circ}\text{C}$  または  $-70^{\circ}\text{C}$  で保存します。

凍結融解を繰り返しても RNA は変性したままなので、ヒートインキュベーションプロトコール（「PAXgene Blood RNA Part B」）を繰り返す必要はありません。診断アッセイで RNA サンプルを使用する場合は、製造者が提供する指示に従います。

260 nm の吸光度で RNA を正確に定量するには、サンプルを 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で希釈することをお勧めします。\*サンプルを RNase フリー水で希釈すると、値が不正確に低くなる可能性があります。

測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー（BR5）と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー（BR5）は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。



Tris-HCl バッファーでの定量には、次の関係を使用します。

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ . 76 ページの付録 B 参照。

17. QIAcube 機器のワークテーブルから試薬ボトルラックを取り外し（QIAcube Connect Mdx : 49 ページの図 21 参照、QIAcube : 50 ページの図 22 参照）、適切にラベル付けした蓋ですべてのボトルを閉じます。ボトルの中のバッファーは、室温（ $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）で最大 3 か月間保存できます。QIAcube 機器マイクロ遠心チューブスロットの処理チューブ（PT）に残っている試薬を取り除き、廃棄します。遠心分離機からローターアダプターを取り外して廃棄します。QIAcube Connect MDx 廃棄物ドロワーを空にします（QIAcube Connect MDx : 43 ページの図 17 参照、QIAcube : 44 ページの図 18 参照）。QIAcube 機器フードを閉じ、電源スイッチで機器の電源を切ります。

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート（SDS）をご参照ください。

# トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは何らかの問題が発生した際にお役に立てください。詳細については、当社のテクニカルサポートセンターの「よくある質問」をご参照ください。[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx) も参照してください。本製品説明書の内容やプロトコール、またはサンプルやアッセイの技術についてご不明な点は、**QIAGEN** テクニカルサービスの専門チームにお問い合わせください（お問い合わせ先については、本書の最終ページまたは弊社ウェブサイト [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) をご参照ください）。

## コメントと推奨事項

---

### 分解した RNA

RNAse コンタミネーション



手順中またはその後の取り扱い中に、試薬に RNase を導入しないようにご注意ください（75 ページの付録 A 参照）。

### RNA 収量が少ない

a) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取した 2.5 mL 未満の血液



血液 2.5 mL が PAXgene Blood RNA Tube (BRT; *PAXgene Blood RNA Tube Handbook* 参照) に採取されていることを確認します。

b) 水中で測定した RNA 濃度







正確に定量するには、RNA を 10 mM Tris-HCl、pH 7.5\* で希釈する必要があります（76 ページの付録 B 参照）。

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。



## コメントと推奨事項

- c) 手動プロトコルのステップ9および10で PAXgene RNA スピンカラム (PRC) に移した細胞破片  手動プロトコルのステップ7で上清をピペットで移すときは、大きな粒子を移さないでください (小さな破片の移動は手順に影響を与えません)。
- d) ステップ3で上清が完全に除去されていない  上清がすべて除去されていることを確認します。上清をデカントする場合は、ペーパータオルを軽く当てて PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の縁から滴を取り除きません。クロスコンタミネーションを防ぐために適切な予防措置を講じてください。
- e) PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に採取後、血液を2時間未満インキュベート  採取後、PAXgene Blood RNA Tube (BRT) で少なくとも2時間血液をインキュベートします。
- $A_{260}/A_{280}$  値が低い
- a)  $A_{260}/A_{280}$  測定用に RNA を希釈する水  純度測定前に、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 を使用して RNA を希釈します \* (76 ページの付録 B 参照)。

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

## コメントと推奨事項

- b) 分光光度計が適切にゼロ調整されていない



測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファ（BR5）と 10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファ

（BR5）は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。

### 機器の誤動作

QIAcube 機器が正しく動作しなかった

トラブルシューティングのセクションに注意しながら、適切な QIAcube ユーザーマニュアルをお読みください。ユーザーマニュアルに記載されているように、QIAcube 機器が適切にメンテナンスされていることをご確認ください。

# 付録 A : RNA 取り扱いの一般的注意事項

## RNA の取り扱い



リボヌクレアーゼ (RNases) は非常に安定した、活性の高い酵素で、通常補因子なしで機能します。RNases の不活性化は困難で、微量でも RNA を破壊します。そのため、プラスチックやガラス器具は RNase による汚染を取り除いてから使用してください。精製の手順の最中とその後で、RNases が RNA に不意に混入しないよう、細心の注意を払ってください。RNase フリーな環境を作り維持するため、RNA の取り扱い中に容器類（使い捨てかどうかを問わず）と溶液の前準備および使用にあたって、ご注意ください。

## 取り扱い全般



RNA の取り扱いでは、適切な微生物学的無菌技術を常に行います。手やほこりの粒子が細菌やカビを運ぶことがあります。これは RNase コンタミネーションの最も多くみられる原因です。試薬と RNA サンプルを取り扱う際には、皮膚表面や機器のほこりによる RNase コンタミネーションを防止するため、常にゴムまたはビニール手袋を使用してください。手袋は頻繁に交換し、チューブの蓋はできる限り閉じるようにします。精製した RNA をダウンストリームで使用するためにピペットで操作する場合、氷で冷却します。

ガラス製品および溶液から RNase コンタミネーションを除去するためのプロトコールは、Sambrook, J. および Russell, D. W. (2001) 分子クローニング：実験マニュアル、第 3 版。Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press などの一般的な分子生物学ガイドに記載されています。

## 付録 B: トータル RNA の品質の定量と測定

### RNA の定量

RNA の濃度は、分光光度計で 260 nm ( $A_{260}$ ) の吸光度を測定して決定する必要があります。有意性を確保するには、読み取り値が分光光度計の線形範囲内にある必要があります。260 nm での 1 ユニットの吸光度は、1 mL あたり RNA 44  $\mu\text{g}$  に相当します ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/mL}$ )。この関係は、10 mM Tris-HCl、pH7.5 で測定した場合にのみ有効です\*。したがって、RNA サンプルを希釈する必要がある時は、10 mM Tris-HCl で希釈する必要があります。以下で説明するように (77 ページの「RNA の純度」参照)、260 nm と 280 nm の吸光度の比率から RNA 純度を推定します。RNA サンプルを測定するときは、キュベットが RNase フリーであることをご確認ください。測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。RNA の定量に関連する計算例を以下に示します。

RNA サンプル量	= 80 $\mu\text{L}$
希釈 (1/15)	= RNA サンプル 10 $\mu\text{L}$ + 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 140 $\mu\text{L}$
キュベット (RNase フリー) で希釈したサンプルの吸光度を測定	
$A_{260}$	= 0.3
サンプル濃度	= $44 \times A_{260} \times \text{希釈係数}$
	= $44 \times 0.3 \times 15$
	= 198 $\mu\text{g/mL}$
総収量	= 濃度 $\times$ サンプル量 (mL)
	= 198 $\mu\text{g/mL} \times 0.08 \text{ mL}$
	= 15.8 $\mu\text{g RNA}$

\* 薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを装着してください。詳細については、製品の供給元が提供する適切な安全データシート (SDS) をご参照ください。

## RNA の純度

260 nm と 280 nm の読み取り値の比率 ( $A_{260}/A_{280}$ ) から、タンパク質などの UV を吸収する汚染物質に関する RNA 純度推定値が得られます。しかし、 $A_{260}/A_{280}$  比は pH の影響を大きく受けます。pH が低いと、 $A_{260}/A_{280}$  比が低くなり、タンパク質汚染に対する感受性が低下します。\*正確な値を得るには、10 mM Tris-HCl、pH7.5 で吸光度を測定することをお勧めします。純粋な RNA の  $A_{260}/A_{280}$  比は、10 mM Tris-HCl、pH 7.5 で 1.8~2.2 です。測定するサンプルと同じ比率の溶出バッファー (BR5) と Tris-HCl バッファーで構成されるブランクを使用して、分光光度計をゼロにします。溶出バッファー (BR5) は 220 nm で高い吸光度を示し、分光光度計を適切にゼロ調整していないと、バックグラウンド吸光度レベルが高くなる可能性があります。

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

## 付録 C : PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の取り扱い



BD からの以下の勧告は、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) を取り扱う際に役立つ場合があります。PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) の詳細については、*PAXgene Blood RNA Tube* ハンドブックをご覧ください。

### BD Hemogard クロージャーの取り外し手順

1. 片手で PAXgene Blood RNA Tube (BRT) をつかみ、親指を BD Hemogard クロージャーの下に置きます。(安定性を高めるために、アームを固体表面にセットします。) もう一方の手で、BD Hemogard クロージャーを回転させながら、その手の親指で同時に押し上げます。チューブストッパーが緩むまで行います。
2. クロージャーを持ち上げる前に親指を離します。PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からクロージャーを親指で押し出してはいけません。注意：PAXgene Blood RNA Tube (BRT) に血液が含まれていると、曝露されるリスクがあります。クロージャー取り外し中の負傷を防ぐには、BD Hemogard クロージャーが緩むとすぐに、クロージャーを押し上げるのに使用していた親指を PAXgene Blood RNA Tube (BRT) から離すことが重要です。
3. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からクロージャーを持ち上げます。万が一、プラスチックシールドがラバーストッパーから外れても、決してクロージャーを再構築しないでください。PAXgene Blood RNA Tube (BRT) からラバーストッパーを慎重に取り外します。

## 二次 BD Hemogard クロージャーの挿入手順

1. PAXgene Blood RNA Tube (BRT) の上のクロージャーを交換します。
2. ストッパーが完全に再度取り付けられるまで、回転させ、しっかりと押し下げます。  
取り扱い中にクロージャーを PAXgene Blood RNA Tube (BRT) にしっかりと固定するには、ストッパーを完全に再挿入する必要があります。

## 発注情報

製品	内容	カタログ番号
PAXgene Blood RNA Kit (50)	PAXgene スピнкаラム 50 個、Shredder スピнкаラム 50 個、処理チューブ、RNase フリー-DNase I、RNase フリー試薬およびバッファー。PAXgene Blood RNA Tube と併用	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	採血チューブ 100 本	762165
<b>QIAGEN に発注できる関連製品</b>		
Starter Pack, QIAcube	パック内容: 試薬ボトルラック (3)、ラックラベル (8)、200 µL フィルターチップ (1024)、1000 µL フィルターチップ (1024)、1000 µL フィルターチップ、ワイドポア (1024)、30 mL 試薬ボトル (18)、ローターアダプター (240)、ローターアダプターホルダー	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	滅菌使い捨てフィルターチップ、ラック入り	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	蓋付き試薬ボトル (30 ml)、6 個入り、QIAcube 装置試薬ボトルラックで使用	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	調製 240 回用: 使い捨てローターアダプター 240 個、QIAcube 機器で使用	990394
Reagent Bottle Rack	QIAcube 機器のワークテーブル上で 6 x 30 mL 試薬ボトルを入れるラック	990390



製品	内容	カタログ番号
Rotor Adapter Holder	12 個の使い捨てローターアダプター用ホルダー、QIAcube 機器で使用	990392
<b>BD に発注できる関連商品*</b>		
Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set : 21G、0.75 インチ (0.8 × 19 mm) 針、ルアーアダプター付き 12 インチ (305 mm) チューブ、ボックスあたり 50 個、ケースあたり 200 個	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	ケースは直径 13 mm および 16 mm のみ。1000 / ケース	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm 4.0 mL ドロー、赤色 BD Hemogard クロージャーとペーパーラベル付き。100 / ボックス、1000 / ケース	368975

\* このような採血アクセサリは、PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) で使用できる典型的な製品です。発注方法など、このようなアクセサリの詳細については、[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) にアクセスしてください。

ライセンスに関する最新情報や商品に固有の免責事項については、それぞれの PreAnalytiX または QIAGEN キットハンドブックまたはユーザーマニュアルをご覧ください。PreAnalytiX および QIAGEN キットハンドブックとユーザーマニュアルは [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) および [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) でご覧いただけます。または、PreAnalytiX テクニカルサービスからも入手できます。

## 製品説明書の改訂履歴

文書と改訂	変更	日付
HB-0101-004、R2	GHS 規制に準拠するよう文書全体で変更	2015 年 6 月
HB-0101-005、R3	新しいテンプレート。自動化プロトコルおよび性能データの改訂。GHS 規制に準拠するための安全情報の更新。機器の詳細および製品の使用制限に関する記述の変更。	2019 年 2 月
HB-0101-006、R3	p. 5 のキット目次のキット名の訂正	2020 年 1 月
HB-0101-007、R4	QIAcube Connect MDx を自動プロトコルに追加。QIAcube Connect Mdx への参照を含むように言語全体を更新。全体で表、ページ、図の番号を更新。	2020 年 12 月

## 世界の PreAnalytiX

PreAnalytiX 製品は、QIAGEN および BD 企業が販売しています

QIAGEN-カスタマーサービスに発注 [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | テクニカルサポート [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | ウェブサイト [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### BD – カスタマーサービス

Argentina, Uruguay and Paraguay  
Orders: 0800.444.5523  
E-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com)

Australia  
Orders: 1.800.656.100  
Fax: 1.800.656.110  
E-mail: [bd\\_anz@bd.com](mailto:bd_anz@bd.com)

Austria  
Orders: 43.1.7063660  
Fax: 43.1.706366011  
E-mail: [customercare.at@bd.com](mailto:customercare.at@bd.com)

Belgium  
Orders: 32.53.720.556  
Fax: 32.53.720.549  
E-mail: [orders.be@bd.com](mailto:orders.be@bd.com)

Brazil  
Orders: 0800.055.56.54  
E-mail: [consultoria\\_vacutainer@bd.com](mailto:consultoria_vacutainer@bd.com)

Canada  
Technical support: 1.800.631.0174  
Orders: 1.866.979.9408  
Fax: 1.800.565.0897  
E-mail: [customer.service.canada@bd.com](mailto:customer.service.canada@bd.com)

Central and Eastern Europe  
Orders: 48.22.377.11.11  
Fax: 48.22.377.11.02  
Bulgaria orders: [info\\_bulgaria@bd.com](mailto:info_bulgaria@bd.com)  
Czech Republic orders: [info\\_czech@bd.com](mailto:info_czech@bd.com)  
Croatia orders: [info\\_croatia@bd.com](mailto:info_croatia@bd.com)  
Hungary orders: [info\\_hungary@bd.com](mailto:info_hungary@bd.com)  
Poland orders: [info\\_poland@bd.com](mailto:info_poland@bd.com)  
Romania orders: [info\\_romania@bd.com](mailto:info_romania@bd.com)  
Southeast Europe orders: [info\\_balkan@bd.com](mailto:info_balkan@bd.com)  
Serbia orders: [info\\_serbia@bd.com](mailto:info_serbia@bd.com)  
Slovakia orders: [info\\_slovakia@bd.com](mailto:info_slovakia@bd.com)

Slovenia orders: [info\\_slovenia@bd.com](mailto:info_slovenia@bd.com)

Denmark  
Orders: 45.43.43.45.66  
Fax: 45.43.96.56.76  
Orders: [ordre.dk@bd.com](mailto:ordre.dk@bd.com)  
Technical support: [bddenmark@bd.com](mailto:bddenmark@bd.com)

Finland  
Orders: 358.9.88.70.780  
Fax: 358.9.88.70.7816  
Orders: [tilaukset.fi@bd.com](mailto:tilaukset.fi@bd.com)  
E-mail: [bdsuomi@bd.com](mailto:bdsuomi@bd.com)

France  
Orders: 33.476.68.36.36  
Fax: 33.476.68.36.93  
E-mail: [serviceclientbdf@bd.com](mailto:serviceclientbdf@bd.com)  
Orders: [commandesfr@bd.com](mailto:commandesfr@bd.com)  
Technical support: [vacutainerfr@bd.com](mailto:vacutainerfr@bd.com)

Germany  
Orders: 49.6221.3050  
Fax: 49.6221.305.216  
E-mail: [customercare.de@bd.com](mailto:customercare.de@bd.com)

India  
Orders: 91.124.3949390  
Orders: [bd\\_india@bd.com](mailto:bd_india@bd.com)

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)  
Customer support: 353.1.404.8350  
Fax: 353.1.404.8352  
E-mail: [contactus@aquilantscientific.ie](mailto:contactus@aquilantscientific.ie)

Israel (Lapidot Medical)  
Customer Support: 972.700.70.90.22  
E-mail: [cs@lapidot.com](mailto:cs@lapidot.com)

Italy  
Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775  
Technical support: 39.3450655140  
E-mail: ordini.it@bd.com

Middle East & Africa  
Orders: 971.45.592.555  
Fax: 971.45.592.599  
E-mail: EMA\_PAS@bd.com

The Netherlands  
Orders: 31.20.582.94.20  
Fax: 31.20.582.94.21  
Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand  
Orders: 0800.572.468  
Fax: 0800.572.469  
E-mail: nz\_customerservice@bd.com

Norway  
Customer Support: 64.00.99.00  
E-mail: bdnorge@bd.com  
Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia  
E-mail: PAS.SEA@bd.com  
Indonesia orders: 622.1577.1920  
Malaysia orders: 603.2093.8788  
Philippines orders: 63.2478.8881  
Singapore orders: 65.6861.0633  
Thailand orders: 662.646.1800  
Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea  
Orders: 02.3404.3706  
Fax: 02.3404.3785  
Technical: 02.3404.3706  
Technical support: Korea\_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra  
Orders: 34.91.848.8174  
Customer support: 34.902.27.17.27  
Fax: 34.91.848.8115  
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden  
Orders: 46.8.775.51.00  
Fax: 46.8.645.08.08  
Orders: order.se@bd.com  
Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland  
Orders: 41.61.485.22.24  
Fax: 41.61.485.22.00  
E-mail: infoch@bd.com

UK  
Orders: 0800.917.8776  
E-mail: bduk\_customerservice@bd.com

USA  
Customer support: 800.631.0174  
E-mail: productcomplaints@bd.com

HB-0101-007 1122120JA BD-8945 12/2020  
ドイツ製

